

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA MECCANICA

TESI DI LAUREA

in

Laboratorio Di Meccanica Dei Tessuti Biologici M

**SVILUPPO ED APPLICAZIONE DI UN PROTOCOLLO PER LA
CARATTERIZZAZIONE MECCANICA A TRAZIONE DEL
TESSUTO OSSEO CORTICALE**

CANDIDATO
Alberto Bandini

RELATORE:
Chiar.mo Prof. Luca Cristofolini

CORRELATORI
Prof. Ing. Giangiacomo Minak
Prof. Ing. Martino Pani
Ing. Massimiliano Baleani

Anno Accademico 2012/13

Sessione II

INDICE

INDICE.....	1
SOMMARIO	5
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE SUL TESSUTO OSSEO.....	7
1.1 L'APPARATO SCHELETRICO UMANO.....	7
1.2 MORFOLOGIA DELLE OSSA LUNGHE.....	9
1.3 ANATOMIA DEL FEMORE UMANO	10
1.4 COMPOSIZIONE DEL TESSUTO OSSEO	12
1.5 LE CELLULE DEL TESSUTO OSSEO	12
1.6 LE STRUTTURE DEL TESSUTO OSSEO	14
1.6.1 L'OSSO CORTICALE	15
1.6.2 L'OSSO TRABECOLARE.....	16
1.7 COMPORTAMENTO MECCANICO DEL TESSUTO OSSEO CORTICALE: STATO DELL'ARTE	17
1.7.1 ANISOTROPIA DEL TESSUTO	19
1.7.2 INOMOGENEITA' DEL TESSUTO	20
1.7.3 VISCOELASTICITA' E TEMPERATURA.....	20
1.7.4 CONSERVAZIONE DEI PROVINI	21
1.7.5 EFFETTO DELL'ETA'	23

CAPITOLO 2: DISEGNO DELL'ESPERIMENTO	25
2.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	25
2.2 CONFIGURAZIONE DI CARICO	25
2.3 IDENTIFICAZIONE DEL DISTRETTO ANATOMICO	27
2.4 DIMENSIONI DEL PROVINO	29
2.5 ESTRAZIONE DEI PROVINI	31
2.5.1 TRACCIATURA DEI PIANI DI RIFERIMENTO ANATOMICI	32
2.5.2 PRELIEVO CAMPIONE DI TESSUTO PER L'ANALISI DEL COLLAGENE E LA CARATTERIZZAZIONE MECCANICA.....	32
2.5.3 INCLUSIONE DEL SETTORE DI TESSUTO DESTINATO ALL'ESTRAZIONE DEI PROVINI PER LA CARATTERIZZAZIONE MECCANICA.....	34
2.5.4 ESTRAZIONE DI LAMINE DI TESSUTO OSSEO CORTICALE	35
2.5.5 SAGOMATURA DEI PROVINI	37
2.5.6 LEVIGATURA DEI CAMPIONI	39
2.6 VERIFICA DELLA PROCEDURA	40
CAPITOLO 3: PROGETTO DEI SISTEMI DI APPLICAZIONE DEL CARICO E DI MISURA.....	43
3.1 INTRODUZIONE	43
3.2 PROGETTO DEL MODELLO SPERIMENTALE PER L'APPLICAZIONE DEL CARICO	43
3.3 PIANIFICAZIONE DEL POSIZIONAMENTO DEL PROVINO ED APPLICAZIONE DEI SISTEMI DI MISURA.....	45
3.4 REALIZZAZIONE DEI SISTEMI DI AFFERRAGGIO DEL PROVINO	48
3.5 COLLEGAMENTO CON LA MACCHINA DI PROVA	52

CAPITOLO 4: CARATTERIZZAZIONE MECCANICA DEL TESSUTO OSSEO CORTICALE	55
4.1 INTRODUZIONE	55
4.2 MATERIALI	55
4.3 ESTRAZIONE DEI PROVINI	56
4.3.1 TRACCIATURA DEI PIANI DI RIFERIMENTO ANATOMICI SULLA DIAFISI	56
4.3.2 PRELIEVO DEI CAMPIONI DI TESSUTO PER L'ANALISI DEL COLLAGENE E LA CARATTERIZZAZIONE MECCANICA	57
4.3.3 INCLUSIONE DELL'ESTREMITA' DISTALE	59
4.3.4 ESECUZIONE DEI TAGLI PARALLELI	60
4.3.5 SAGOMATURA DEI PROVINI	64
4.3.6 LEVIGATURA.....	66
4.3.7 MISURA DELLE DIMENSIONI DEL PROVINO	67
4.4 MISURA DELLE DEFORMAZIONI CON CORRELAZIONE DIGITALE DI IMMAGINI.....	68
4.4.1 CALIBRAZIONE DEL DIC	69
4.4.2 REALIZZAZIONE DEL PATTERN	73
4.5 MISURA DELLE DEFORMAZIONI CON TRASDUTTORE MECCANICO	74
4.6 POSIZIONAMENTO DEL PROVINO SULL'ATTREZZATURA	75
4.7 POSIZIONAMENTO IN MACCHINA	76
4.8 ESECUZIONE DELLA PROVA	78
4.9 SCANSIONE MEDIANTE MICROTOMOGRFIA COMPUTERIZZATA	79
4.10 ANALISI DEI DATI	80
4.10.1 MISURE CON CORRELAZIONE DIGITALE DI IMMAGINI	80
4.10.2 MISURE CON TRASDUTTORE MECCANICO	81
4.10.3 ANALISI STATISTICA	83

CAPITOLO 5: RISULTATI.....	85
5.1 ACQUISIZIONE CON IL SISTEMA DIC	85
5.2 ACQUISIZIONE CON IL SISTEMA MECCANICO E CONFRONTO CON IL SISTEMA DIC.....	87
5.3 CARATTERIZZAZIONE DEL TESSUTO OSSEO CORTICALE	90
CAPITOLO 6: DISCUSSIONI.....	93
6.1 IL MODELLO SPERIMENTALE.....	93
6.2 SVILUPPI FUTURI	98
CONCLUSIONI.....	99
BIBLIOGRAFIA.....	101
RINGRAZIAMENTI.....	107

SOMMARIO

Nel presente elaborato viene descritta l'attività di tesi da me svolta presso il Laboratorio di Tecnologia Medica presente all'interno dell'Istituto Ortopedico Rizzoli. Nel laboratorio è in corso di svolgimento uno studio mirato a correlare le proprietà meccaniche del tessuto osseo corticale con la qualità e la distribuzione delle fibre di collagene per verificare se tali caratteristiche siano influenzate dal tipo di sollecitazione a cui il tessuto si trova sottoposto fisiologicamente. All'interno di tale studio si inserisce il mio lavoro il cui obiettivo è di progettare ed implementare un protocollo per la caratterizzazione meccanica del tessuto osseo corticale. Il distretto anatomico studiato è il femore prossimale. Infatti è dimostrato come in tale zona il tessuto osseo corticale risulti sollecitato in vivo a compressione in posizione mediale e a trazione in posizione laterale. Per eseguire lo studio è stato deciso di utilizzare una prova di trazione semplice in modo da poter ricavare il contributo del collagene, su provini orientati longitudinalmente all'asse del femore. Nella prima parte del lavoro ho perciò progettato l'esperimento stabilendo la geometria dei provini e la procedura sperimentale necessaria alla loro estrazione. Successivamente ho progettato e realizzato il sistema di applicazione del carico coerentemente con il posizionamento dei sistemi di misura. In particolare per la misura delle deformazioni imposte al provino ho utilizzato sia un sistema meccanico che un sistema ottico basato sulla correlazione digitale di immagine. Quest'ultimo sistema permette di elaborare una mappa degli spostamenti e delle deformazioni su tutta la superficie del provino visibile dalle telecamere, purchè adeguatamente preparata per la misura con sistema ottico. La preparazione prevede la realizzazione di un pattern stocastico ad elevato contrasto sulla superficie. L'analisi dei risultati, oltre a dimostrare il corretto svolgimento della prova, ha evidenziato come siano presenti differenze significative tra le proprietà meccaniche di ciascun soggetto ad eccezione del tasso di deformazione necessario per imporre al provino una deformazione permanente pari allo 0.2%. Infatti tale parametro risulta invariante. È stato rilevato inoltre come non siano presenti differenze significative o comunque rilevanti tra le proprietà meccaniche del tessuto estratto in zone differenti nonostante sia sollecitato fisiologicamente principalmente con sollecitazioni differenti.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE SUL TESSUTO OSSEO

1.1 L'APPARATO SCHELETRICO UMANO

L'apparato scheletrico (Figura 1.1) rappresenta l'impalcatura del corpo. È formato da varie ossa tenute assieme per mezzo dei legamenti (Sears 1975).

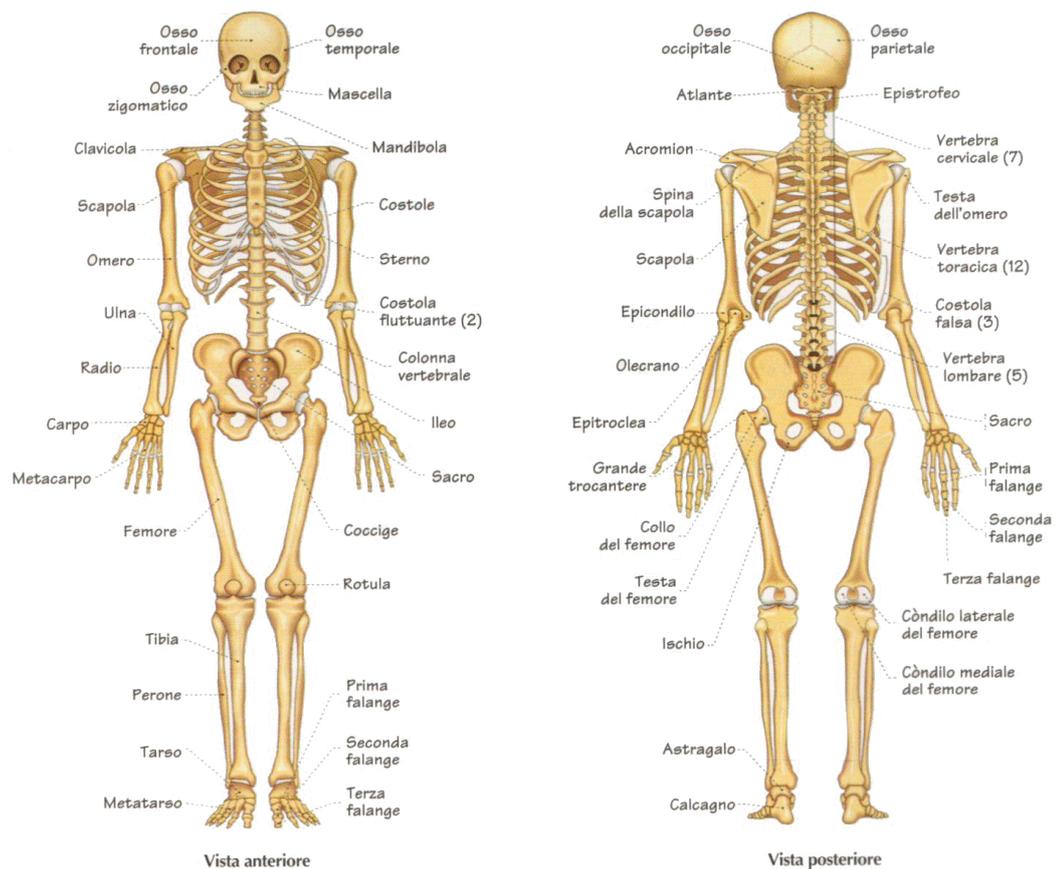


Figura 1.1 – Lo scheletro umano

Le principali funzioni dello scheletro possono essere riassunte come segue:

- *funzione di supporto*: lo scheletro serve da impalcatura e da sostegno ai tessuti molli;
- *funzione di movimento*: Molte ossa fungono da leva per i muscoli che prendono inserzione su di esse permettendo liberi movimenti e consentendo sia la stabilità che la mobilità;
- *funzione di protezione*: protegge organi e strutture delicate. Ad esempio le ossa racchiudono il cervello, il midollo osseo, il midollo spinale ed il cuore;
- *ematopoiesi*: formazione nel midollo osseo delle cellule sanguigne;
- *funzione di riserva minerale*: il tessuto osseo gestisce il bilancio di Calcio in modo che il suo livello nel sangue sia costante. I minerali in eccesso nel sangue vengono trasportati all'interno dell'osso e immagazzinati in esso.

Per soddisfare tali caratteristiche è necessario che i tessuti ossei risultino rigidi per evitare eccessive deformazioni e tenaci così da assorbire e dissipare energia negli urti. Le ossa possono essere classificate in quattro gruppi sulla base della loro forma e alla loro struttura (Williams, 1995; Sears, 1975):

- *ossa lunghe*: presentano una dimensione sensibilmente maggiore rispetto alle altre due e sono di forma approssimativamente cilindrica nella parte centrale. Hanno il principale compito di consentire i movimenti fungendo da leve per i muscoli ad esse vincolati. Esempi tipici ne sono offerti dalle ossa del braccio, dell'avambraccio, della coscia e della gamba;
- *ossa corte o brevi*: caratterizzate da una forma cubica irregolare. Hanno movimenti molto contenuti limitati a semplici scorrimenti per permettere la flessione dell'arto. Esempi tipici si possono trovare nelle piccole ossa del polso (carpo) e della caviglia (tarso);
- *ossa piatte*: hanno forma appiattita e svolgono principalmente la funzione di protezioni degli organi interni (es. cranio);
- *ossa irregolari*: a causa della forma complessa non trovano una sistemazione appropriata in alcuna delle categorie considerate. Comprendono le vertebre e la maggior parte delle ossa della faccia.

1.2 MORFOLOGIA DELLE OSSA LUNGHE

Le ossa lunghe sono caratterizzate principalmente da tre zone: la diafisi, la metafisi e l'epifisi (Figura 1.2).

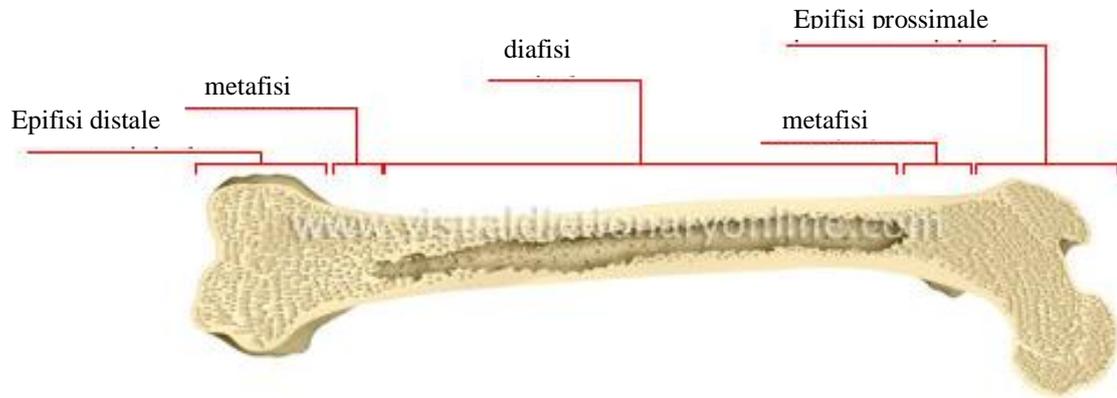


Figura 1.2 – Morfologia osso lungo

- La *diafisi* è la parte centrale di forma quasi cilindrica la quale, durante la vita, racchiude al proprio interno il midollo osseo giallo, una materia molle e giallastra contenente tessuto adiposo.
- Le *epifisi* sono le estremità costituenti l'articolazione. Presentano una forma rotondeggiante in modo da consentire l'inserzione dei legamenti sull'osso i quali agendo sulle articolazioni provocano una maggiore stabilità. Data la necessità di interagire con le ossa vicine le epifisi sono ricoperte di cartilagine articolare. All'interno di tali zone è presente nella maggior parte dei casi midollo giallo tranne che per l'omero e il femore in cui è contenuto midollo rosso.
- Le *metafisi* raccordano diafisi ed epifisi.

Sia la superficie esterna dell'osso che la superficie interna del canale midollare sono rivestiti da una membrana sottile di tessuto cartilagineo che prende il nome rispettivamente di periostio ed endostio.

1.3 ANATOMIA DEL FEMORE UMANO

Per maggior chiarezza riguardo agli argomenti che verranno sviluppati in seguito si ritiene utile fornire una breve descrizione dell'anatomia del femore umano. Il femore (Figura 1.3) è l'osso più lungo e più robusto di tutto lo scheletro ed è costituito da un corpo centrale detto diafisi e da due estremità irregolari dette epifisi. L'estremità superiore presenta una *testa*, un *collo* e due *trocanteri*:

- la *testa* ha forma emisferica ed è ricoperta da cartilagine articolare ialina. È accolta nell'acetabolo dell'osso coxale per formare l'articolazione dell'anca. Subito al di sotto del punto centrale della sua superficie convessa si osserva una piccola depressione (fossetta della testa) per attacco del legamento rotondo;
- il *collo* si estende verso l'alto e l'interno formando con il corpo un angolo di circa 125°, e termina con la testa;
- il *grande trocantere* è un grosso processo che sporge verso l'alto dalla parte superiore del corpo, per cui si trova ubicato sulla parte laterale del collo. Il suo tratto superiore si curva verso l'interno e sovrasta il collo producendo una piccola depressione denominata fossa trocanterica. La sua superficie esterna è il punto di inserzione di alcuni muscoli;
- il *piccolo trocantere* è rappresentato da una protuberanza rotonda situata all'estremità superiore del corpo in corrispondenza della superficie postero-mediale dove si continua nel collo. È il punto di inserzione del muscolo ileopsoas.

Una cresta ossea che congiunge sulla faccia posteriore del femore il piccolo con il grande trocantere prende il nome di *linea intertrocanterica*. Il corpo ha forma pressochè cilindrica, eccetto che nel suo terzo inferiore, in corrispondenza del quale va gradualmente appiattendosi ed allargandosi. L'estremità inferiore è formata da due *condili*, mediale e laterale, separati posteriormente dalla *fossa intercondilea*, i quali si articolano con le rispettive tuberosità della tibia per formare l'articolazione del ginocchio. La cartilagine articolare che riveste ciascuno dei due condili si continua sulla faccia anteriore dell'osso dove forma una superficie articolare con la rotula. Subito al di sopra del condilo mediale si nota un piccolo tubercolo, il *tubercolo adduttore*, sul quale prende inserzione il muscolo grande adduttore (Sears, 1975).

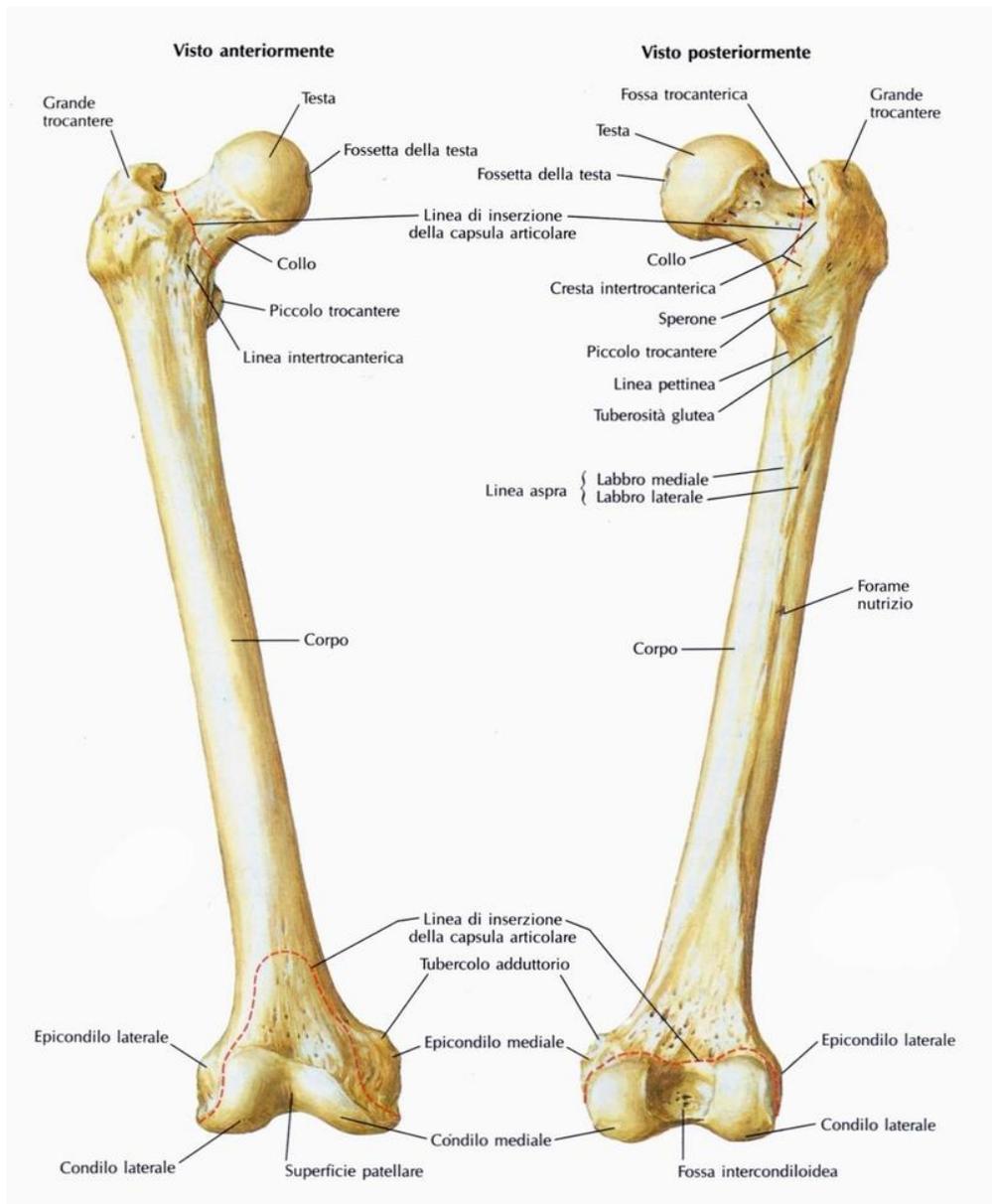


Figura 1.3 – Vista anteriore e posteriore del femore umano

1.4 COMPOSIZIONE DEL TESSUTO OSSEO

La principale caratteristica del tessuto osseo è la mineralizzazione della matrice extracellulare il che lo rende, tra tutti i tessuti connettivi, quello con i valori maggiori di rigidità e resistenza meccanica. L'osso, come tutti i tessuti connettivi, è caratterizzato da un'elevata percentuale di matrice extracellulare ed in particolare è costituito da:

- *30% di componente organica*: costituita principalmente da collagene (circa il 90%) e di proteoglicani, lipidi e cellule per la restante frazione;
- *60% di componente minerale*: in prevalenza si tratta di fosfati e carbonati di Calcio tra cui principalmente apatite di Calcio e Fosforo $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ simile a idrossiapatite ma non stechiometrica. Tale minerale forma piccoli cristalli i quali si dispongono nella stessa direzione delle fibre di collagene;
- *10% acqua*.

Nell'ottica delle prestazioni meccaniche la componente minerale fornisce rigidità e un elevato carico di rottura a discapito di un'elevata fragilità la quale è compensata dalla componente organica in grado di apportare tenacità e cedevolezza.

1.5 LE CELLULE DEL TESSUTO OSSEO

Le cellule presenti nell'osso vengono generalmente classificate come segue (Cowin, 2001; Malluche and Faugere, 1986; Weiss, 1990):

- *cellule osteoprogenitrici*: si trovano principalmente nello strato interno del periostio e nell'endostio ed hanno la capacità di differenziarsi e specializzarsi in cellule mature;
- *osteoblasti*: sono le cellule responsabile della produzione e della deposizione dei costituenti dell'osso. Intervengono nel momento in cui è necessario formare nuovo tessuto osseo riunendosi in gruppi attorno ai vasi e secernendo fibre di collagene e sostanza amorfa (matrice osteoide); con l'aumentare del quantitativo di matrice osteoide, gli osteoblasti si dispongono in un unico strato attorno ad essa. Successivamente quando si raggiungono le condizioni necessarie alla mineralizzazione tali cellule si dividono e formano uno strato più esterno dedicato a proseguire la deposizione di matrice osteoide mentre lo strato più interno emette dei prolungamenti e si trasforma in osteociti;

- *osteociti*: sono le cellule mature dell'osso e vengono contenute in piccole cavità all'interno della matrice dette lacune ossee. Probabilmente si tratta di osteoblasti rimasti intrappolati nella struttura. Sono caratterizzati da una forma molto irregolare dotata di prolungamenti circondati da matrice mineralizzata detti canalicoli ossei. Hanno la funzione di connettere le cellule tra loro e con i vasi presenti nell'endostio, nel periostio e nei canali vascolari allo scopo di rendere possibile lo scambio di sostanze nutritive e di regolare il rimodellamento o la riparazione del tessuto osseo;
- *osteoclasti*: sono le cellule dedicate al riassorbimento del tessuto osseo che deve essere sostituito nel processo continuo di rimodellamento che ha luogo per tutto l'arco della vita. Si rapportano con l'osso da riassorbire con una loro superficie e, grazie alla produzione di enzimi e altre sostanze, sono in grado di distruggere la matrice, di mobilizzare i sali minerali e di riassorbire il Calcio. Il riassorbimento del tessuto osseo operato dagli osteoclasti svolge un ruolo importante nel corso dei processi di rigenerazione e rimodellamento: il tessuto osseo infatti, risponde ad un meccanismo che lo rende in grado di adattarsi dinamicamente alle richieste di stress meccanico (Bilezikian, Lawrence G. Raisz et al., 2008). La *legge di Wolff* sostiene appunto che l'osso si adatta a seconda dei carichi a cui è sottoposto: se il carico aumenta l'osso si rimodella nel tempo per diventare più forte e resistere a quel tipo di carico; al contrario, se il carico diminuisce, il rimodellamento determina un riassorbimento del tessuto ovvero l'osso diventa più debole e metabolicamente meno costoso da mantenere;
- *cellule di rivestimento*: al termine della formazione del tessuto osseo alcuni osteoblasti diventano quiescenti e assumono una forma appiattita. In questa forma vengono chiamati cellule di rivestimento e svolgono principalmente compiti di regolazione della mineralizzazione ossea e dell'omeostasi dei fosfati e del Calcio.

1.6 LE STRUTTURE DEL TESSUTO OSSEO

Il tessuto osseo è il costituente principale di tutto lo scheletro. Tale tessuto è meccanicamente molto resistente, e al tempo stesso relativamente leggero. Questo compromesso ottimale resistenza/peso dipende dalla sua organizzazione interna (Cristofolini, 2013). L'osso può essere di due tipologie principalmente: *non lamellare* e *lamellare*. Il primo è un tessuto in cui le fibre di collagene non sono distribuite regolarmente ma sono raccolte in grossi fasci paralleli o intrecciati in cui le lacune sono disperse irregolarmente. Questa tipologia ossea può essere riscontrata negli scheletri meno evoluti (es. pesci, uccelli, anfibi) e in quelli fetali/embrionali dei mammiferi. Il tessuto osseo lamellare invece consiste di lamelle di spessore da 3 a 7 μm in cui le fibrille di collagene sono orientate con forte parallelismo (Cowin, 2001); tale organizzazione rappresenta l'elemento principale nello scheletro di mammiferi adulti. La lamella è quindi l'unità elementare la cui differente organizzazione origina i diversi tipi di tessuto osseo ivi presenti (Figura 1.4):

- *l'osso corticale* o *compatto*: con l'eccezione dei canalicoli microscopici è una massa piena, molto dura e resistente. Presenta al proprio interno un quantità di tessuti molli inferiore al 10% e consiste di circa l'80% del peso dello scheletro;
- *l'osso trabecolare* o *spongioso*: è un reticolo di asticelle, archi e piccole placche contenente il midollo e in grado di occupare fino al 75% del volume (Cowin, 2001).

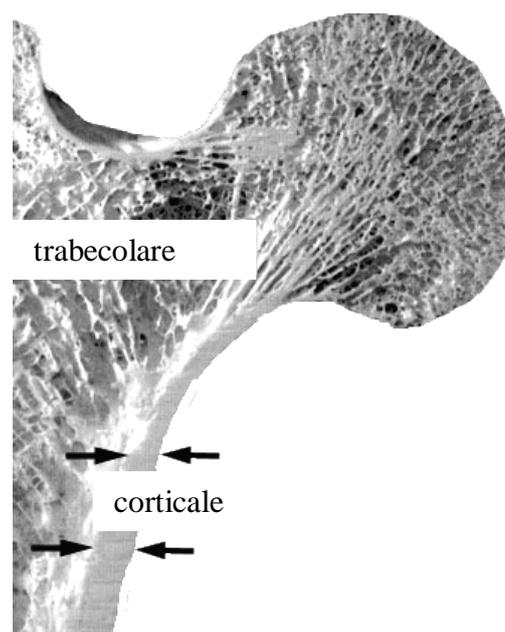


Figura 1.4 – Strutture ossee

1.6.1 L'OSSO CORTICALE

Nell'osso corticale (Figura 1.5) le lamelle assumono tre differenti disposizioni (Cristofolini, 2013):

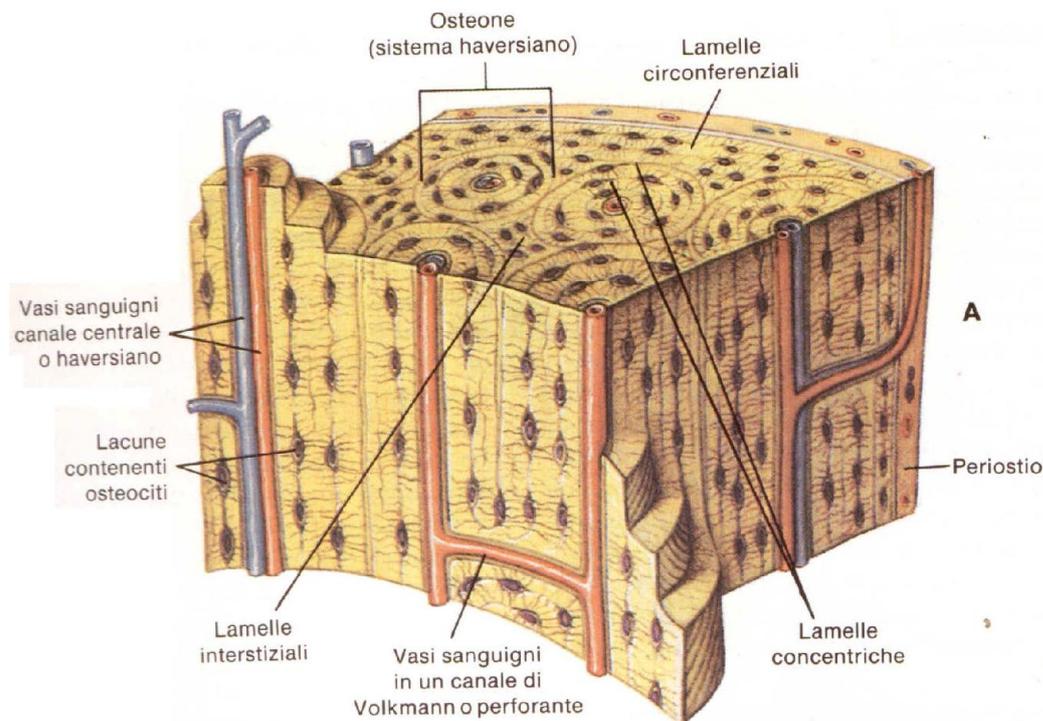


Figura 1.5 – L'osso corticale

- le *lamelle circolferenziali* si sviluppano in numerosi strati avvolgendo il corpo intero dell'osso senza interruzioni. Tali lamelle ricoprono la superficie esterna dell'osso corticale, immediatamente sotto al periosteo e la superficie interna, in adiacenza con l'endosteo;
- le *lamelle concentriche* (Figura 1.5) sono costituite da fasci circolari di 4-20 lamelle attorno ad un canale vascolare longitudinale in cui l'orientazione delle fibre di collagene varia per ogni successiva lamella. L'insieme del canale centrale (detto anche *canale Haversiano*) e delle lamelle concentriche forma un *osteone* o *sistema Haversiano* avente un diametro caratteristico di circa 200 μm . I *canalicoli* o *canali di Volkmann* formano insieme ai canali Haversiani una rete tridimensionale collegata al periostio ed al midollo osseo in grado di fornire l'alimentazione alle cellule. Ogni osteocita infatti si trova in una lacuna collegata da almeno un canalicolo. Ciascun osteone è inoltre circondato da uno strato di

circa 2 μm di matrice mineralizzata povera in fibra di collagene detta *linea cementante*;

- le *lamelle interstiziali* (Figura 1.6) infine riempiono gli spazi tra i vari sistemi Haversiani e sono formate da frammenti di osteoni e lamelle circolari ricostruiti durante il processo di rigenerazione.



Figura 1.6 – L'osteone

1.6.2 L'OSSO TRABECOLARE

L'osso trabecolare o spongioso adulto è costituito da un reticolo di trabecole interconnesse tra loro e di diversa forma con spessore minore a 0.2 mm (Figura 1.7). Le cavità interstiziali sono riempite di midollo rosso in cui avviene la formazione delle cellule sanguigne. Similmente alla struttura dell'osteone, ogni trabecola è composta da un mosaico di segmenti angolari formati da lamelle impacchettate parallelamente tra loro. Analogamente all'osso compatto sono presenti le linee cementanti atte ad unire i pacchetti di lamelle ma contrariamente alla struttura dell'osteone, nelle trabecole non sono presenti i canali Haversiani in quanto gli osteociti presenti nell'osso spongioso si alimentano direttamente dal midollo.

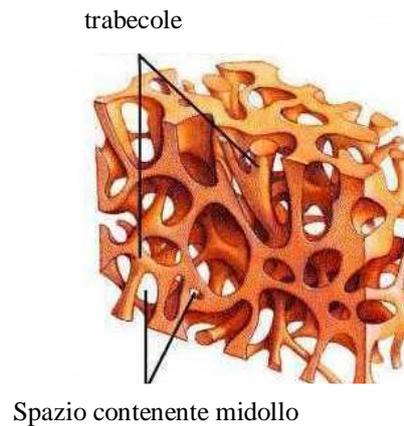


Figura 1.7 – L'osso trabecolare

Essendo costituito da una struttura porosa, l'osso trabecolare risulta meno resistente e meno rigido dell'osso corticale ma l'elevata deformabilità e tenacità permettono di assorbire una grande quantità di energia prima della rottura. Le principali funzioni che esso svolge sono le seguenti:

- irrigidimento della struttura;
- distribuzione delle sollecitazioni;
- trasferimento dei carichi all'osso corticale circostante;
- protezione delle ossa lunghe da fenomeni di instabilità.

1.7 COMPORTAMENTO MECCANICO DEL TESSUTO OSSEO CORTICALE: STATO DELL'ARTE

Le proprietà meccaniche dell'osso corticale sono tutt'oggi oggetto di studio e ricerca. L'osso corticale è stato studiato usando le prove standardizzate per la caratterizzazione dei materiali. Effettuando test a trazione su provini di geometria standardizzata è stato possibile valutare come tale tessuto presenti generalmente un carico di rottura compreso tra 100 e 200 MPa raggiungibile con un tasso di deformazione a rottura variabile tra l'1% e il 2% (Kaneko, 2002; Cristofolini 2013). Riguardo al modulo elastico sono stati rilevati valori compresi tra 10 e 20 GPa mentre lo snervamento si raggiunge per tassi di deformazione pari allo 0.6% circa. Un'ulteriore importante caratteristica dell'osso corticale è la tenacità cioè l'energia necessaria per portare a rottura il materiale. Tale

grandezza calcolata come l'area sottesa dalla curva tensione-deformazione è stata stimata attorno a 3400 J/m^2 per il tessuto costituente il femore (Currey, 1990). Numerosi studi sono stati eseguiti applicando i criteri della meccanica della frattura applicata al tessuto osseo compatto. L'adozione della teoria elasto-plastica con provini prismatici intagliati caricati secondo uno schema flessionale a tre punti ha evidenziato come tale tessuto presenti valori critici dell'integrale J compresi tra 3500 e 6000 N/m (Li, 2013b). Per quanto riguarda la tenacità alla frattura, l'uso dei classici provini compact-tension ha invece rilevato valori della tenacità iniziale K_0 variabili attorno al valore di $2 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$ con un tasso di crescita lineare all'aumentare della cricca pari a circa $0.4 \text{ MPa}\sqrt{\text{m/mm}}$ (Nalla, 2004). Infine per quanto concerne la meccanica della frattura lineare elastica il fattore di intensificazione degli sforzi K_{IC} raggiunge valori fino a $6 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$ (Koester, 2008; Zioupos, 1998). Occorre sottolineare come sia stato rilevato un differente comportamento del tessuto se caricato a compressione, ovvero quando il tessuto è sollecitato a compressione aumentano fino al 50% sia il carico di rottura che il tasso di deformazione a snervamento (Kaneko, 2002). Tale aumento è stato rilevato anche per il tessuto osseo trabecolare (Morgan, 2001). In condizioni fisiologiche l'osso si danneggia a fatica ma ciò è bilanciato dal rimodellamento osseo. Infatti se la velocità di danneggiamento non supera la possibilità di riparazione del tessuto non si arriva mai a frattura. In caso contrario si originano microfratture e fratture vere e proprie a fatica. Il tessuto osseo corticale, analogamente agli acciai, presenta un livello di carico al di sotto del quale non si arriva a rottura in vivo (Figura 1.8) mentre un provino d'osso sottoposto a carichi ciclici in vitro si danneggia a fatica e può arrivare a rottura (Cristofolini, 2013).

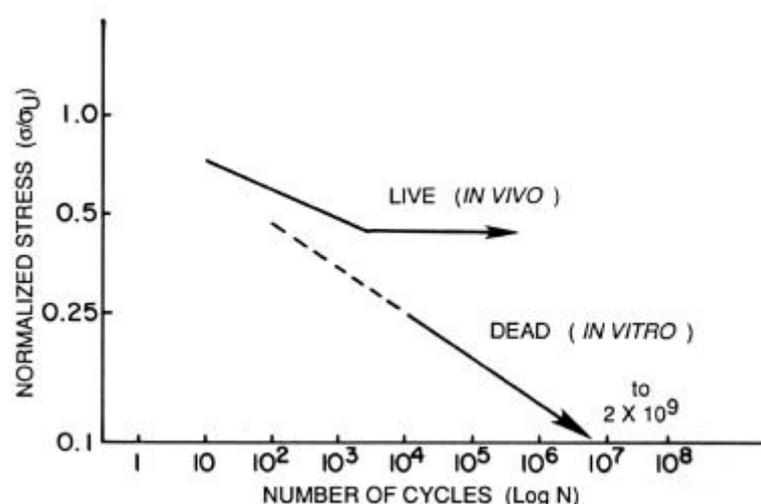


Figura 1.8 – Curva di Wöhler per provini di osso in vivo e in vitro (Fung, 1993)

1.7.1 ANISOTROPIA DEL TESSUTO

Essendo adibito a sostenere la maggior parte dei carichi agenti sullo scheletro, molti studi si sono concentrati sulla caratterizzazione meccanica del tessuto osseo corticale nelle tre direzioni anatomiche delle ossa lunghe: longitudinale, trasversale e radiale. Infatti la presenza del collagene e della componente minerale fa sì che il tessuto osseo corticale si presenti come un materiale composito naturale. Test a trazione effettuati sia su tessuto umano che su animale hanno dimostrato come la direzione longitudinale sia quella di maggior resistenza e come le proprietà si riducano sensibilmente in direzione trasversale. In particolare sia il carico di rottura che il modulo elastico presentano riduzioni fino al 50% dei valori ottenuti in direzione longitudinale (Abdel-Wahab, 2010; Li, 2013a). Un andamento ancora più marcato con riduzioni fino all'80% in direzione trasversale sono stati rilevati per la sola fase del collagene su provini privati della componente minerale (Leng, 2012). Tale anisotropia risulta invece meno marcata sollecitando il tessuto a flessione. Infatti in tal caso per provini estratti in direzione longitudinale e trasversale si ottengono valori comparabili mentre riduzioni sensibili fino al 50% si presentano in direzione radiale (Szabò, 2012). Anche test relativi alla meccanica della frattura hanno mostrato una forte anisotropia del tessuto. Per quanto riguarda la teoria elasto-plastica si nota come il valore della tenacità a frattura J passi, da valori compresi tra 3800 e 6000 N/m nel caso in cui la cricca si propaghi in direzione trasversale, a valori compresi tra 950 e 2700 N/m per direzioni di propagazione radiale e longitudinale (Li, 2013b). Analizzando invece le curve di resistenza alla propagazione della cricca nel caso della teoria nonlineare-elastica si nota come il fattore di intensificazione degli sforzi K , nonostante parta da valori paragonabili di circa $2 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$ sia per direzione di propagazione della cricca trasversale che longitudinale, raggiunga valori fino a $25 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$ nel primo caso ma solo $5 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$ nel secondo caso (Koester, 2008).

1.7.2 INOMOGENEITA' DEL TESSUTO

Il tessuto osseo corticale è non omogeneo perciò le proprietà meccaniche possono variare da punto a punto. Tali variazioni sono legate principalmente alle diverse funzioni del tessuto nelle varie aree. In particolare sono due le cause di tale disomogeneità nelle prestazioni (Cristofolini, 2013):

- la densità ossea, che è un indicatore del minerale contenuto;
- le porosità, che indeboliscono la struttura e fungono da intensificatori degli sforzi.

Test a trazione applicati a femore bovino hanno analizzato l'andamento delle proprietà meccaniche in funzione della frazione di tessuto occupata dagli osteoni, compresa tra 0 e 1, indicativo della densità ossea. È stato verificato come raddoppiando quest'ultimo parametro da 0.3 a 0.6 si verifici una riduzione del modulo elastico da 35 a 20 GPa mentre il carico di rottura passa da 250 a 100 MPa (Yamada, 2012). La disomogeneità ha un ruolo fondamentale anche per la meccanica della frattura. Infatti uno studio effettuato su provini CT ha evidenziato come, relativamente alle curve di resistenza, la tenacità iniziale K_0 si dimezzi e il tasso di crescita si riduca fino a 4 volte passando da 10 a 30 osteoni per mm^2 (Nalla, 2006). Un ulteriore studio ha invece verificato come il tasso di rilascio dell'energia misurato secondo modo I (G_{IC}) e modo II (G_{IIC}) di carico sia correlato negativamente con la porosità: all'aumentare della porosità dal 5 al 20% si verificano riduzioni intorno al 50% per entrambi i tassi di rilascio energetico (Yeni, 1997).

1.7.3 VISCOELASTICITA' E TEMPERATURA

Il tessuto osseo allo stato naturale presenta un comportamento viscoelastico che può essere schematizzato (Figura 1.9) da due molle rappresentanti i cristalli di idrossiapatite e da un dissipatore avente il ruolo delle fibre di collagene.

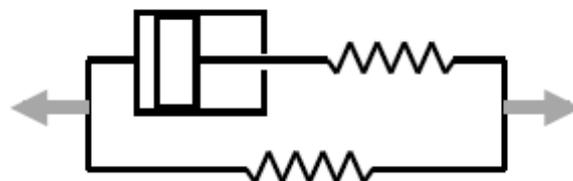


Figura 1.9 – schematizzazione dell'osso

In particolare lo smorzatore, essendo sensibile alla velocità di carico, comporta che all'aumentare della velocità di sollecitazione il materiale tenda ad irrigidirsi, a diventare meno duttile e più resistente (Figura 1.10).

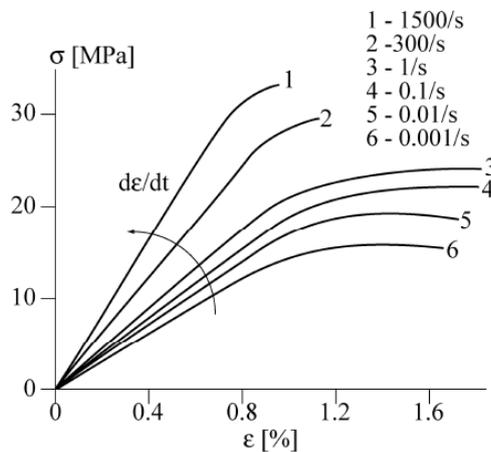


Figura 1.10 – Curve sforzo-deformazione per osso compatto in funzione della velocità di deformazione in prova di trazione (McElhane, 1966)

Anche la temperatura dell'ambiente di prova influenza le proprietà meccaniche del tessuto osseo infatti per una misura accurata i provini dovrebbero essere testati alla temperatura di 37°C in analogia con le condizioni di sollecitazione in vivo. A tal proposito è stato dimostrato come uno scostamento da tale temperatura fino a un valore di 23°C comporti un incremento del modulo elastico tra il 2 e il 4 %. Occorre sottolineare inoltre come una temperatura di prova di 37°C faciliterebbe la disidratazione dei provini, il cui effetto è molto maggiore rispetto a quello descritto per la temperatura (Ashman, 1982; Bonefield, 1968; Bonefield, 1982).

1.7.4 CONSERVAZIONE DEI PROVINI

Le proprietà meccaniche del tessuto osseo sono determinate per via sperimentale in vitro. Ciò non stupisce se si analizza il fatto che la maggior parte del tessuto osseo è costituito da una matrice inorganica mentre la parte vivente costituita dalle cellule, la quale può alterarsi con la morte, da un contributo minimo alle proprietà meccaniche (Cristofolini, 2006). Le caratteristiche meccaniche sono inoltre influenzate dal metodo di conservazione. Due metodi risultano adatti alla conservazione del tessuto osseo dopo la

morte del donatore: il congelamento e la fissazione chimica. Essendo il congelamento un metodo ampiamente utilizzato, numerosi studi hanno investigato l'effetto del congelamento sulle caratteristiche meccaniche dimostrando come il congelamento a temperature inferiori a -20°C non alteri significativamente le proprietà del tessuto osseo (Goh, 1989; Hamer, 1996; Linde, 1993; Sedlin, 1966; Weaver, 1966).

Un ulteriore studio ha testato provini di forma cilindrica estratti da diafisi di femore umano e tibia bovina allo scopo di confrontare al congelamento 3 differenti metodi di conservazione del tessuto: il fissaggio in formalina, l'imbalsamazione con metodo Thiel e il fissaggio in glicerina. I confronti sono stati effettuati a sei mesi di distanza dal fissaggio e hanno presentato le seguenti differenze significative:

- il fissaggio in formalina causa un decremento del tasso di deformazione a rottura e del lavoro di plasticizzazione per il tessuto umano mentre non causa variazioni per il tessuto bovino;
- il fissaggio con metodo Thiel causa un decremento nel modulo elastico per il tessuto osseo umano mentre comporta un innalzamento nel tasso di deformazione a rottura e nel lavoro di plasticizzazione sia per il tessuto umano che per quello bovino;
- il fissaggio in glicerina comporta per il tessuto umano un incremento nella tensione a rottura e nel lavoro elastico mentre per il tessuto bovino causa oltre a un aumento della tensione a rottura, un decremento del lavoro di plasticizzazione.

Per quanto concerne la densità della componente minerale dell'osso nessuno dei vari metodi di conservazione causa differenze significative rispetto al congelamento (Unger, 2010). Nell'osso inoltre è presente una quantità d'acqua compresa tra il 10 e il 20% in peso la quale influisce sulle proprietà meccaniche. Infatti il tessuto fresco idratato ha un comportamento elasto-plastico, presenta una certa duttilità, un creep marcato ed una maggiore tenacità. Al contrario se disidratato ha un comportamento elastico fragile, è meno tenace, ha modulo di elasticità più elevato e la componente viscosa è meno marcata.

1.7.5 EFFETTO DELL'ETA'

Il deterioramento della qualità del tessuto osseo con l'avanzare dell'età è la principale causa delle fratture negli anziani. A tal proposito molti studi sono stati effettuati con l'obiettivo di quantificare tale degrado nelle proprietà meccaniche. Da tali ricerche è stato evidenziato come la maggior parte delle proprietà meccaniche decada con l'avanzare degli anni ed in particolare passando da 30 a 90 anni circa si verifica che (Koester, 2010; Zioupos, 1998; Nalla, 2006):

- il modulo elastico presenta riduzioni fino a 2 GPa;
- la tenacità cala circa di 2 KJ/m²;
- la tensione di rottura si riduce di 40 MPa;
- la tenacità a frattura elasto-plastica J in direzione longitudinale cala di 100 N/m;
- il fattore di intensificazione degli sforzi K_{IC} si riduce di 0.5 MPa√m;
- la tenacità iniziale a frattura K_0 decresce di circa 1 MPa√m;
- il tasso di crescita della tenacità all'aumentare della cricca cala fino ad annullarsi.

Analizzando a trazione invece le sole proprietà del collagene è risultato un decadimento delle prestazioni tale da dimezzare il carico di rottura e il modulo di elasticità longitudinale mentre il modulo di elasticità trasversale si riduce di un fattore 3 (Leng, 2012). Un ulteriore studio ha invece evidenziato come all'aumentare dell'età del tessuto crescano sia il numero di microcricche presenti nel tessuto che la lunghezza di queste (Zioupos, 2000).

CAPITOLO 2

DISEGNO DELL'ESPERIMENTO

2.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO

I dati pubblicati recentemente in letteratura suggeriscono che il collagene giochi un ruolo fondamentale per le caratteristiche meccaniche del tessuto osseo corticale. Per studiare in dettaglio il ruolo del collagene è in corso di svolgimento presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli uno studio mirato a correlare le proprietà meccaniche del tessuto osseo corticale con la qualità e la distribuzione delle fibre di collagene per verificare se tali caratteristiche siano influenzate dal tipo di sollecitazione a cui il tessuto si trova sottoposto. Lo studio è eseguito in collaborazione con altri centri di ricerca che devono studiare la qualità e l'organizzazione delle fibre di collagene analizzando campioni di tessuto osseo al sincrotrone. Presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli è invece pianificata la caratterizzazione del tessuto osseo corticale prelevato in zone contigue alle zone in cui è studiato il collagene. All'interno di tale studio si inserisce il mio lavoro il cui obiettivo è di progettare ed eseguire la caratterizzazione meccanica del tessuto osseo corticale. Alla luce anche di quanto analizzato tramite la revisione della letteratura, di seguito verranno esposte le problematiche affrontate e le varie scelte effettuate nella fase di progettazione dell'esperimento.

2.2 CONFIGURAZIONE DI CARICO

Il collagene è disposto in fibre all'interno del tessuto osseo corticale. In analogia con la meccanica dei materiali compositi il contributo delle fibre alla resistenza del materiale risulta preponderante nel caso di sollecitazione a trazione con direzione di applicazione del carico parallela alla direzione delle fibre. Per ricavare il contributo del collagene alla resistenza della struttura è necessario perciò applicare, almeno su parte del provino, una sollecitazione di trazione in quanto, a compressione, si avrebbe il collasso della matrice

minerale compromettendo l'integrità del tessuto prima di poter misurare il contributo del collagene (Reilly, 1974; Reilly, 1975). Come descritto nel capitolo precedente, molti studi si sono occupati della resistenza a trazione e della tenacità del tessuto osseo corticale sia umano che animale. I diversi approcci adottati si possono classificare in tre gruppi:

- prove di trazione;
- prove di flessione;
- prove di propagazione della frattura.

Dopo aver revisionato la bibliografia è stata scelta una tipologia di prova a “trazione semplice”. La trazione semplice è infatti quella che meglio si adatta agli obiettivi dello studio dato che è l'unica in grado di sollecitare a trazione l'intera sezione del provino. In questo modo un qualsiasi effetto sulle proprietà meccaniche dovuto alla distribuzione e qualità del collagene viene rilevato durante la prova dato che la totalità delle fibre presenti nel provino è sollecitata dal medesimo grado di deformazione. La prova di flessione invece sollecita il provino sia a trazione che a compressione in posizioni opposte all'asse neutro. Pertanto i risultati sarebbero influenzati dalle caratteristiche del tessuto che costituisce il lato teso del provino. Tali considerazioni non sono da sottovalutare alla luce della disomogeneità del tessuto osseo corticale esposta nel capitolo precedente (Cfr. 1.7.2). Considerazioni analoghe sono valide per i classici provini compact-tension tipici della meccanica della frattura. La forma di questi provini è specifica per sollecitare solo localmente il tessuto, precisamente quello che si trova sul piano di frattura. Mentre per i materiali omogenei questo approccio è appropriato, per i materiali non omogenei come il tessuto osseo diventa discutibile soprattutto in un caso come il mio in cui non è possibile realizzare un numero elevato di provini ma si è costretti ad una ridotta dimensione campionaria. Infatti si correrebbe il rischio di osservare un'ampia dispersione dei dati e diventerebbe problematico per poter correlare osservazioni sulla struttura e sulle proprietà meccaniche eseguite in zone adiacenti. Inoltre non è da trascurare la complicazione nell'estrazione e nella realizzazione del provino in particolare la realizzazione di un intaglio preciso. Per tali considerazioni ho deciso di scegliere la caratteristica conformazione denominata “parallel sided test piece” ovvero “provino a facce parallele”.

Questa geometria offre tre vantaggi:

- deformazione omogenea nella porzione utile del provino;
- possibilità di estrarre un numero maggiore di provini a parità di dimensioni del campione del tessuto;
- le caratteristiche superfici piane risultano idonee anche per misure con strumenti ottici, qualora anche questo approccio volesse essere adottato.

2.3 IDENTIFICAZIONE DEL DISTRETTO ANATOMICO

L'obiettivo dello studio è correlare le proprietà meccaniche del tessuto osseo corticale con la qualità e la distribuzione delle fibre di collagene per verificare se tali caratteristiche siano influenzate dal tipo di sollecitazione a cui il tessuto si trova sottoposto. A tal proposito è necessario che il sito anatomico da cui si preleveranno i provini sia caratterizzato da:

- dimensioni del tessuto osseo corticale idonee alla possibile estrazione dei provini descritti in precedenza;
- zone del medesimo sito anatomico che siano state sollecitate fisiologicamente *in vivo* a compressione adiacenti a zone sollecitate fisiologicamente *in vivo* a trazione.

Tra i vari distretti anatomici possibili tali caratteristiche risultano soddisfatte nel femore, più precisamente nella parte prossimale. Molti studi sono stati effettuati sullo stato di sollecitazione nella parte prossimale del femore umano dovuta a carichi fisiologici. In generale lo studio delle sollecitazioni a cui è soggetto il tessuto osseo corticale è eseguito analizzando la distribuzione delle deformazioni. Considerando solo i carichi fisiologici questi studi (Cristofolini, 2008; Cammertoni, 2011) hanno dimostrato che:

- in posizione mediale il tessuto osseo risulta sollecitato in maniera predominante a compressione mentre in posizione laterale a trazione;
- tali sollecitazioni predominanti risultano orientate longitudinalmente ovvero lungo l'asse del femore;
- le deformazioni rilevate in posizione anteriore e posteriore invece si ottengono valori comparabili tra trazione e compressione in funzione del carico applicato alla testa del femore;

- l'ordine di grandezza delle deformazioni non varia tra le regioni di testa, il collo e la diafisi prossimale;
- le direzioni principali delle deformazioni variano sensibilmente nelle diverse posizioni anatomiche ma rimangono circa invariate al variare delle configurazioni di carico.

Questi risultati dimostrano che l'anatomia della parte prossimale del femore è in grado di rispondere adeguatamente alle variazioni quotidiane di direzione della forza agente sull'articolazione. A titolo di esempio vengono riportate di seguito (Figura 2.1, Figura 2.2), i valori e le direzioni principali delle deformazioni per un campione. Dal punto di vista anatomico è dimostrato che nel femore prossimale, più precisamente sotto al piccolo trocantere, ci si possa aspettare uno spessore di tessuto osseo corticale superiore a 5 mm (Croker, 2009; Treece, 2010). L'analisi della letteratura ha quindi dimostrato come il sito del femore prossimale, sotto al piccolo trocantere, risulti il distretto anatomico cercato per l'estrazione dei provini in quanto:

- presenta sul lato mediale una zona che *in vivo* risulta prevalentemente sollecitata fisiologicamente a compressione mentre sul lato laterale una zona prevalentemente sollecitata a trazione;
- le direzioni principali delle deformazioni principali sopra citate rimangono circa invariate al variare delle configurazioni di carico e risultano circa longitudinali.

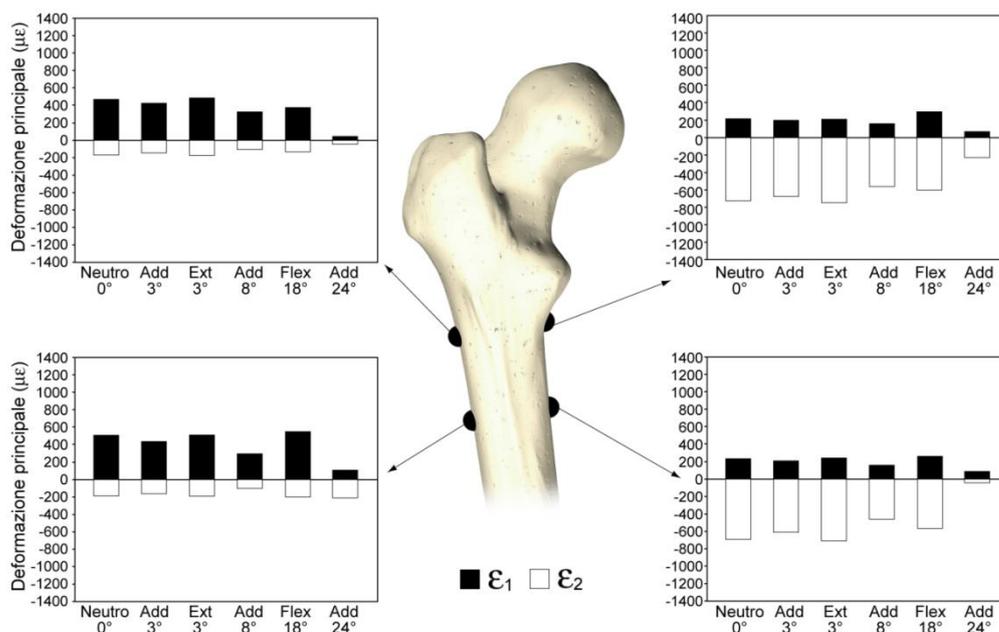


Figura 2.1 - Deformazioni della regione prossimale del femore nelle prove di simulazione di azioni quotidiane in campo elastico (Cammertoni, 2011)

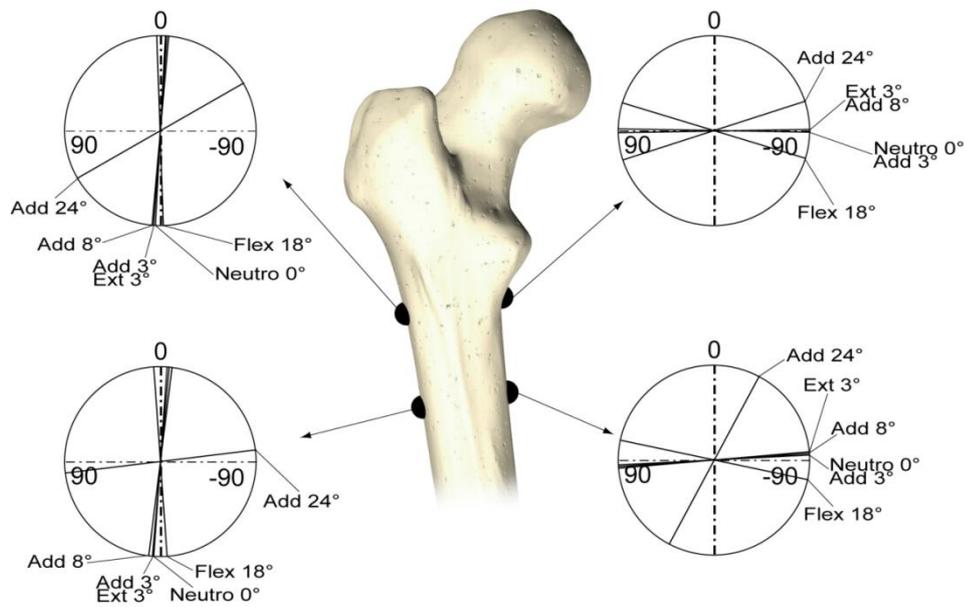


Figura 2.2 - Direzione della deformazione principale di trazione del femore nelle prove di simulazione di azioni quotidiane in campo elastico (Cammertoni, 2011)

2.4 DIMENSIONI DEL PROVINO

L'obiettivo è estrarre provini longitudinalmente all'asse del femore in modo che le facce sagomate parallele abbiano la normale uscente alla superficie, parallela alla direzione trasversale del tessuto osseo corticale (Figura 2.3).

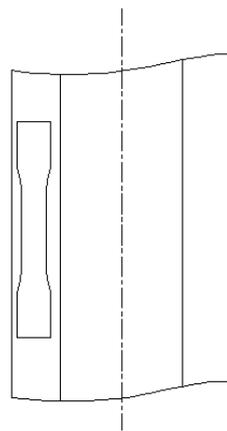


Figura 2.3 – posizionamento generico del provino in una sezione longitudinale di osso lungo

Come riferimento per la scelta delle dimensioni del provino ho seguito la norma UNI EN ISO 6892-1 relativa alle prove di trazione a temperature ambiente per materiali metallici. In particolare ho analizzato il provino caratteristico per le lamiere. Le principali problematiche in tale fase di studio riguardavano la scelta delle dimensioni della sezione costituente il tratto calibrato del provino. Per la larghezza del tratto calibrato ho scelto un valore di 4mm per i seguenti motivi:

- il tratto calibrato deve avere una larghezza inferiore rispetto agli afferraggi in modo da diminuire la sezione resistente e causare la rottura nel tratto calibrato. A tal proposito ricordo che nel distretto anatomico scelto il tessuto osseo corticale ha spessori maggiori o uguali di 5 mm il che permette di poterlo ridurre fino a 4 mm;
- in accordo con la norma UNI EN ISO 6892-1 viene richiesto una larghezza degli afferraggi maggiore o uguale a 1.2 volte quella del tratto calibrato.

Per lo spessore del provino ho scelto un valore di 1 mm per tre motivi:

- essendo il tessuto osseo corticale costituito da osteoni aventi mediamente un diametro di 0.2 mm (Cfr. 1.6.1), la scelta di uno spessore del provino pari a 1 mm, assicura in teoria la presenza di almeno 5 osteoni sebbene l'organizzazione reale sia più complessa. Ciò permette di analizzare la struttura macroscopicamente. In caso contrario non verrebbe analizzata la risposta della struttura poichè la dimensione si avvicinerebbe troppo a quella del singolo osteone;
- la scelta di uno spessore ridotto permette l'estrazione di un numero maggiore di provini a parità della dimensione del campione di tessuto osseo oggetto di studio;
- la norma UNI EN ISO 6892-1 prevede, nel caso di lamiere, spessori da 0.1 a 3 mm.

Per quanto riguarda la lunghezza utile del tratto calibrato ho scelto un valore di 10 mm a seguito di quanto esposto nella normativa UNI EN ISO 6892-1 secondo cui:

$$L_0 = k\sqrt{S_0}$$

Dove L_0 rappresenta la lunghezza del tratto utile del provino, k è una costante che può assumere a propria discrezione i valori 5.65 o 11.3, mentre S_0 indica la sezione del tratto utile. Nel caso in esame, per ridurre gli ingombri ho scelto un valore k pari a 5.65. Essendo la sezione 4 mm^2 coerentemente con le scelte precedenti si ottiene un valore di L_0 pari a 11.3 il quale, arrotondato ad un multiplo di 5 come richiesto dalla normativa, dà luogo ad una lunghezza utile di 10 mm. Il passaggio dalla larghezza di 4 mm del tratto utile fino ai 5 mm previsti come valore minimo per l'afferraggio avviene con un raggio di

raccordo di 20 mm. Infine, per eliminare le problematiche relative all'afferraggio del provino ho scelto una lunghezza totale di 35 mm. Di seguito (Figura 2.4) viene riportato un disegno del provino con le relative dimensioni ed un particolare relativo alla zona di raccordo.

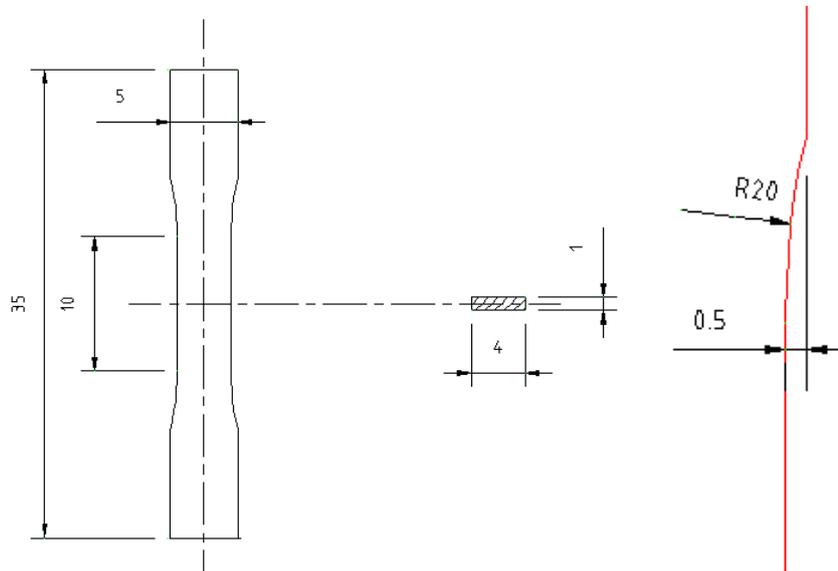


Figura 2.4 – dimensioni del provino (sinistra) e dimensioni della zona di raccordo in cui la linea rossa indica il profilo esterno del provino (destra)

2.5 ESTRAZIONE DEI PROVINI

La fase successiva del disegno dell'esperimento riguarda la pianificazione di tutte le fasi operative necessarie per estrarre i provini, di geometria definita precedentemente, dal sito anatomico prescelto. Per ogni operazione sono analizzate le problematiche e i vincoli derivanti dalle specifiche di progetto in modo da definire la procedura operativa caratteristica di ogni fase e da giustificare le scelte effettuate. Le fasi di taglio in cui la lama risulta a contatto con le superfici che andranno a costituire il provino saranno eseguite con abbondante lubrificazione e con lama diamantata. In tali condizioni, asportando il materiale per abrasione, non verrà danneggiato il tessuto adiacente ai piani di taglio. Ciascuna operazione inoltre deve essere eseguita il più rapidamente possibile per evitare lo scongelamento del provino o quantomeno di ridurne il tempo di permanenza scongelato.

2.5.1 TRACCIATURA DEI PIANI DI RIFERIMENTO ANATOMICI

La prima fase operativa è la tracciatura dei quattro piani di riferimento anatomici sulla diafisi del femore. Questa fase deve obbligatoriamente essere la prima in quanto è necessario che il femore sia intatto. La tracciatura dei piani laterale, mediale, anteriore e posteriore è fondamentale per i seguenti motivi:

- essendo lo studio focalizzato sulla caratterizzazione del tessuto osseo in posizione laterale e mediale, è fondamentale l'identificazione univoca di tali piani anatomici sia per l'estrazione dei provini da sollecitare meccanicamente, che per l'analisi della qualità e distribuzione del collagene;
- la procedura di tracciatura deve identificare i piani anatomici in maniera analoga e univoca per qualsiasi femore;
- la tracciatura, longitudinale all'asse del femore, dei quattro piani anatomici permette in qualsiasi momento di poter verificare il parallelismo o la perpendicolarità del femore rispetto ad un piano, a seguito di un qualsiasi posizionamento.

Per la tracciatura è necessaria una iniziale pulizia accurata dei femori. Successivamente si deve procedere con la tracciatura dei piani di riferimento anatomici seguendo un protocollo validato reperito in letteratura scientifica (Ruff, 1983) il quale è stato integrato con un protocollo interno del Laboratorio di Tecnologia Medica (Cristofolini, 1995). Questa procedura soddisfa le esigenze dello studio.

2.5.2 PRELIEVO CAMPIONE DI TESSUTO PER L'ANALISI DEL COLLAGENE E LA CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Identificati i piani di riferimento anatomici sul femore, devo identificare la zona da cui estrarre i campioni di tessuto necessari all'analisi della qualità e dell'organizzazione del collagene e per la caratterizzazione meccanica. Per effettuare la prima analisi viene richiesta una sezione trasversale del femore di spessore pari a 0.1 mm in posizione distale. Su questa sezione verrà eseguita l'analisi identificativa della qualità del collagene.

Per poter estrarre tali sezioni è necessaria una porzione di femore di lunghezza pari a 15 mm per due motivi:

- permettere un corretto afferraggio sulla macchina con cui verranno estratte le sezioni;
- permettere l'estrazione di più sezioni in modo poterne estrarre fino a che una non soddisfa le specifiche richieste.

Per eseguire la seconda analisi, oggetto del mio studio, è necessario estrarre un' ulteriore porzione di femore di lunghezza 46 mm, posizionata distalmente rispetto alla porzione estratta precedentemente (Figura 2.5).

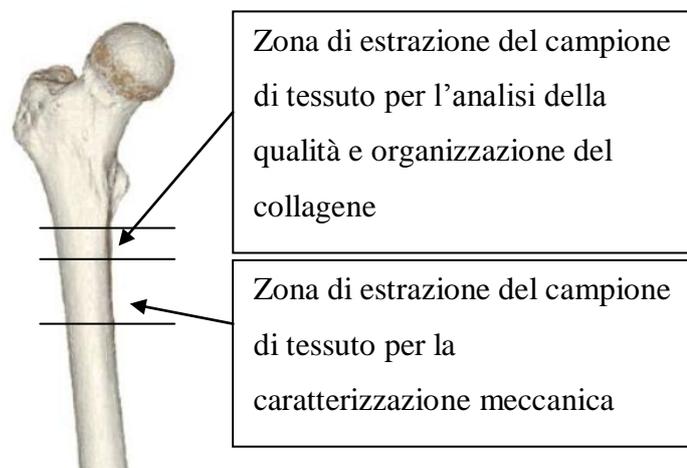


Figura 2.5 – identificazione delle zone di estrazione dei campioni di tessuto

Tale valore, maggiore della lunghezza del provino, è determinato dalla necessità di permettere un afferraggio sul settore osseo da cui si dovranno successivamente estrarre provini di lunghezza pari a 35 mm, i quali dovranno risultare liberi. Il settore di femore richiesto per l'analisi della qualità e l'organizzazione del collagene verrà estratto 15 mm al di sotto del piccolo trocantere mentre la fetta di spessore 0.1 mm verrà estratta in posizione distale per i seguenti motivi:

- posizionandosi appena sotto al piccolo trocantere, tale settore di 15 mm, verrà prelevato da un distretto anatomico in cui il lato mediale *in vivo* è stato sollecitato prevalentemente a compressione dai carichi fisiologici mentre il lato laterale è stato sollecitato prevalentemente *in vivo* a compressione dai carichi fisiologici. Questo permetterà di evidenziare eventuali differenze nella qualità e organizzazione del collagene dovute a sollecitazioni fisiologiche opposte;

- il prelievo di una sezione in posizione distale fornirà il dato relativo alla qualità del collagene in una posizione di tessuto adiacente, e il più possibile contigua, a quella in cui si eseguirà la caratterizzazione meccanica poichè i provini destinati alla caratterizzazione meccanica verranno prelevati, dal settore femorale, in posizione prossimale.

L'estrazione delle porzioni di diafisi è possibile per mezzo di una troncatrice metallografica dotata di un disco di taglio diamantato. L'utilizzo di una troncatrice metallografica assicura la perpendicolarità del piano di taglio con il piano di riscontro.

2.5.3 INCLUSIONE DEL SETTORE DI TESSUTO DESTINATO ALL'ESTRAZIONE DEI PROVINI PER LA CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Ho deciso di includere l'estremità distale del campione destinato alla caratterizzazione meccanica per 10 mm in una resina acrilica, la quale sarà colata tra il segmento osseo posizionato in verticale e un apposito stampo costituito da un settore circolare in PVC realizzato precedentemente. Per permettere un migliore afferraggio della resina sul tessuto osseo eseguirò inoltre con una raspa tre scassi trasversali ad una quota inferiore ai 10 mm dall'estremità distale. Tale procedura risulta necessaria in quanto:

- essendo la diafisi di forma irregolare, variabile da femore a femore, la superficie esterna non si presta ad essere vincolata in un mandrino. Questo è invece necessario per poter eseguire i tagli paralleli al piano frontale;
- il settore circolare, rimanendo incollato alla resina, fornisce un afferraggio idoneo per una morsa radiale;
- realizzando l'afferraggio in posizione distale si prevede l'estrazione dei provini in posizione prossimale perciò contigua a quella su cui verrà effettuata l'analisi della qualità e dell'organizzazione del collagene. L'analisi delle proprietà in zone adiacenti permette la successiva correlazione delle due grandezze in esame;
- essendo la colata eseguita con il provino in posizione verticale, ed avendo quest'ultimo le superfici di taglio perpendicolari alle tracciatore, la superficie distale della colata risulta perpendicolare all'asse longitudinale del segmento osseo.

2.5.4 ESTRAZIONE DI LAMINE DI TESSUTO OSSEO CORTICALE

Nella seguente operazione prevedo di estrarre dal segmento osseo ottenuto dalle fasi precedenti, delle sezioni longitudinali di tessuto osseo corticale di spessore pari a 1.1 mm. Per l'esecuzione di tali tagli utilizzerò una sega a nastro posizionando il segmento in modo che la superficie trasversale prossimale ottenuta dal taglio alla troncatrice sia incidente con la lama della sega a nastro. La lama sarà dotata del moto di taglio mentre il provino del moto di avanzamento. La scelta della sega a nastro è dettata dalle seguenti motivazioni:

- la lama a nastro assicura un fronte di taglio lineare al contrario di quanto accadrebbe con una lama circolare;
- il moto di avanzamento è regolato da una guida lineare. Ciò assicura che le sezioni tagliate abbiano spessore costante;
- la lama ha uno spessore di 0.8 mm. Questo permette di asportare una quantità minima di materiale e di poter quindi estrarre più provini dal medesimo sito anatomico;
- la presenza di una vite micrometrica permette di traslare trasversalmente il piano di taglio e di eseguire tale spostamento con precisione centesimale;
- la presenza di un fine-corsa nella guida lineare permette di regolare l'avanzamento della lama assicurando una lunghezza costante per ogni taglio.

Il posizionamento del segmento osseo con la superficie prossimale incidente con la lama avverrà per mezzo di un mandrino divisore. Questo viene reso solidale alla guida lineare della sega a nastro per mezzo di una piastra forata che ho realizzato in laboratorio partendo da un semilavorato in lega di alluminio di sezione 150x15 mm (Figura 2.6). La scelta del mandrino divisore è dettata dalle seguenti motivazioni:

- è dotato di una morsa radiale con tre morsetti idonea a bloccare il provino sulla superficie esterna del cilindro di resina in cui è inclusa la parte distale del campione;
- mandando in battuta la superficie distale dell'afferraggio contro un piano della morsa, dotata di gradini, si assicura che l'asse della porzione di diafisi sia parallelo all'asse del mandrino;
- la possibilità di ruotare di 90° l'asse del mandrino, insieme alla possibilità di regolare il piano di taglio con la vite micrometrica della sega a nastro, rende

possibile l'allineamento della lama con il piano passante per le posizioni anatomiche mediale e laterale;

- la possibilità di ruotare di 360° rispetto all'asse parallelo alla lama, passante per le cerniere presenti sul basamento, permette di troncare sulla sega a nastro le sezioni di spessore 1.1 mm ancorate alla porzione di segmento osseo inglobata nell'afferraggio.

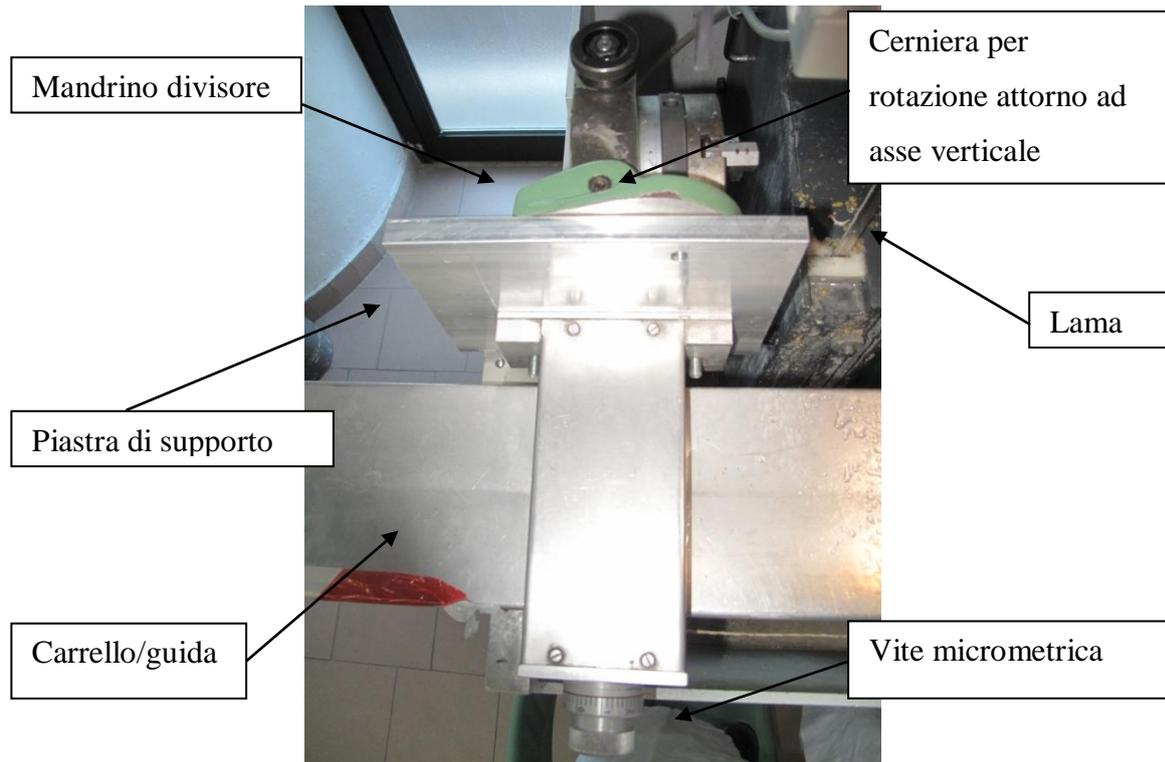


Figura 2.6 – il mandrino divisore montato sulla sega a nastro

2.5.5 SAGOMATURA DEI PROVINI

Per sagomare i provini con la geometria scelta precedentemente, prevedo di utilizzare una fresatrice CNC ad asse verticale su cui verrà montato un utensile diamantato di diametro 3 mm che asporterà il materiale per abrasione. Tale scelta è motivata dai seguenti fattori:

- avendo l'utensile una parte utile pari a 5 mm, permette di eseguire la sagomatura in una unica passata;
- l'utilizzo di una fresatrice CNC permette di ottenere una precisione di lavorazione centesimale;
- utilizzando il medesimo programma per il percorso utensile, quest'ultimo non è soggetto a errori umani il che comporta una sagomatura identica per ogni provino.

Per permettere lo staffaggio del provino ho disegnato un'attrezzatura realizzata in laboratorio anch'essa grazie alla fresatrice CNC. Tale attrezzatura è stata ottenuta per asportazione di truciolo partendo da un semilavorato in lega di alluminio di sezione 100x15 sfruttando due lavorazioni. Tale attrezzatura risulta di fondamentale importanza in quanto:

- tramite due viti M8 permette il fissaggio al piano di appoggio della fresatrice;
- è dotata di una guida nella faccia inferiore in modo che, una volta fissata, le superfici lavorate risultino allineate con l'asse X della fresatrice. Questo perché l'asportazione di truciolo è stata eseguita con l'attrezzatura allineata per mezzo della stessa guida;
- il piano di appoggio del provino è posizionato all'interno di una cava. Riempiendo tale cava con acqua il provino rimarrà idratato durante tutta la fase di sagomatura e si eviterà il surriscaldamento delle superfici di taglio;
- il piano di appoggio del provino è dotato di due battute grazie alle quali sarà possibile posizionare in modo ripetibile ogni provino in direzione trasversale;
- il fissaggio del segmento osseo avviene per mezzo di una barra e di quattro dadi M2.5 che si impegnano su altrettante viti. Tale configurazione consente una pressione regolare sul provino anche dopo il serraggio dei dadi.

La figura seguente (Figura 2.7) illustra l'attrezzatura con l'indicazione degli elementi caratteristici.

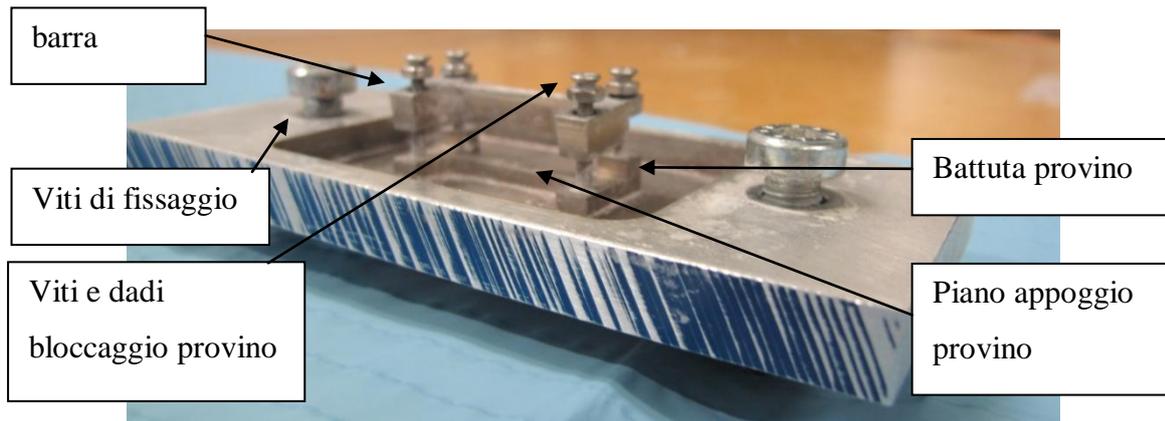


Figura 2.7 – l’attrezzatura di fissaggio del provino alla fresa

Prima di fissare il provino su tale attrezzatura sarà necessaria una carteggiatura con carta abrasiva di granulometria 400 sui due bordi di spessore 1.1 mm. Questa fase permetterà di eliminare le disomogeneità presenti, caratteristiche della geometria ossea, in modo da creare una battuta stabile sull’esterno oltre ad eliminare il tessuto osseo trabecolare eventualmente presente in posizione interna. Il provino verrà quindi posizionato sull’attrezzatura realizzata in battuta con la superficie esterna e fissato grazie ai dadi M2.5 agenti sul coperchio. Regolando la profondità di passata della fresa ad un valore maggiore dello spessore del provino sarà possibile ottenere la sagomatura con una sola lavorazione. Le inomogeneità caratteristiche dello spessore del tessuto osseo corticale di ogni femore fanno sì che tutti i provini, in tale fase, siano differenti tra loro. Per uniformare perciò la sagomatura del provino, in accordo con le dimensioni caratteristiche (Cfr. 2.4), ho deciso di asportare sempre 0.5 mm dalla parte in cui il provino va in battuta, cioè l’esterno dell’osso. Essendo il tratto calibrato di larghezza pari a 4 mm, sull’altro lato verrà automaticamente asportato il tessuto necessario alla corretta sagomatura del provino. In tal modo il tratto calibrato, zona fondamentale del provino, risulta sempre posizionato in maniera univoca su tutti i provini nonostante le variazioni fisiologiche del tessuto. Il percorso utensile è realizzato in modo che l’esterno della fresa diamantata seguirà la geometria del provino definita precedentemente.. Di seguito viene riportato il percorso utensile (Figura 2.8).

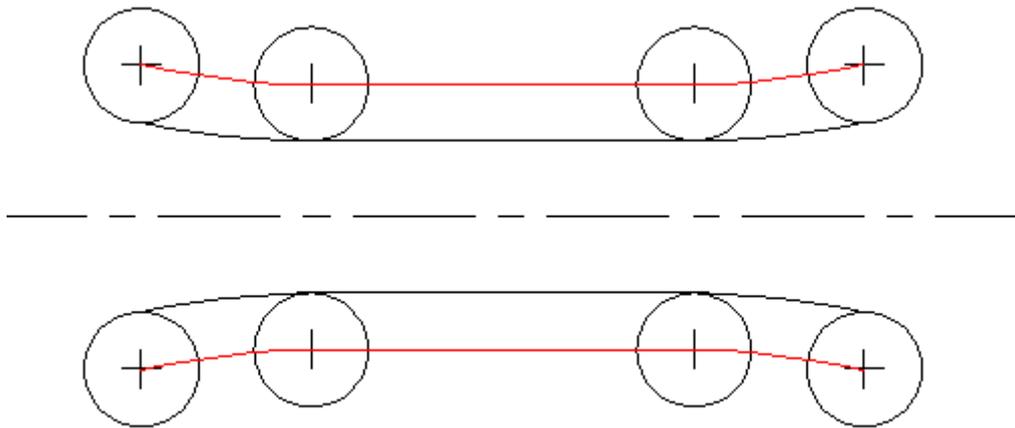


Figura 2.8 – la sagomatura eseguita dalla fresa CNC con in rosso il percorso utensile

2.5.6 LEVIGATURA DEI CAMPIONI

L'ultima fase pianificata per la preparazione del provino è la levigatura delle superfici parallele sagomate. Questa è necessaria per due motivi:

- permette di raggiungere lo spessore di progetto di 1 mm eliminando eventuali errori dovuti ai tagli effettuati nelle fasi precedenti;
- avvenendo per mezzo di carta abrasiva con granulometria 1200 garantisce una rugosità superficiale regolare su tutto il provino con una superficie che visivamente appare lucidata.

La levigatrice vincola il supporto del provino creando una depressione sul lato libero. Per tale motivo è stato necessario realizzare un supporto per vincolare il provino alla levigatrice. Tale supporto (Figura 2.9) è stato realizzato per mezzo di una fresatrice CNC scavando la geometria del provino su un componente in plexiglass in modo da ottenere le seguenti caratteristiche:

- profondità della cava pari a 0.7 mm. In tal modo il provino di spessore 1.1 mm sporgerà per una quota pari a 0.4 mm;
- il tratto calibrato presenta le stesse dimensioni del provino. In tal modo il provino vi si incastrerà perfettamente;
- nella zona degli afferraggi la cava sarà più ampia perchè il provino deve essere vincolato solo nel tratto calibrato.

La levigatrice consente di regolare lo spessore asportato grazie ad una vite micrometrica. Asportando 0.05 mm per ogni lato è possibile levigare entrambe le superficie ed ottenere lo spessore progettato di 1 mm.

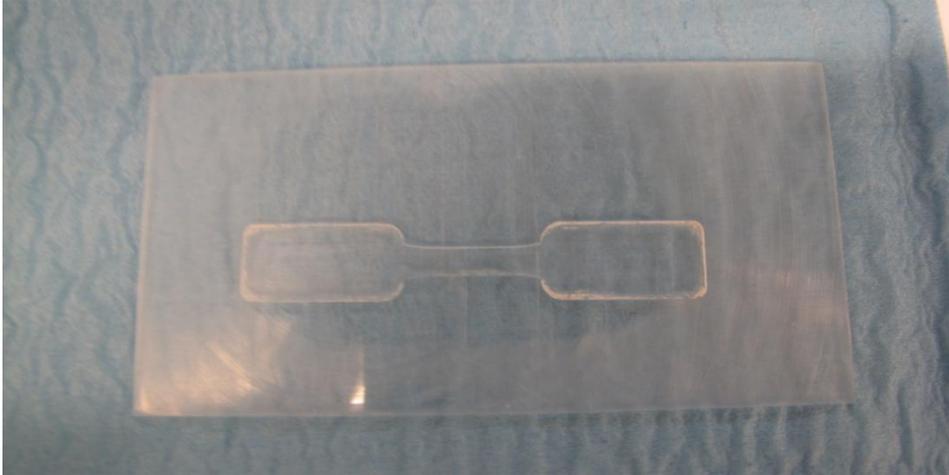


Figura 2.9 – il supporto in PVC per il sostegno del provino durante la levigatura

2.6 VERIFICA DELLA PROCEDURA

La fattibilità della procedura esposta è stata verificata su campioni di tessuto animale. Più precisamente ho estratto i settori di lunghezza 46 mm dalla parte prossimale di femore suino. Tale verifica ha dimostrato la possibilità di estrarre correttamente i provini disegnati precedentemente con l'unica differenza data, in alcuni di essi, da una larghezza del tratto calibrato di 3 mm. Tale variazione è dovuta al fatto che il tessuto osseo corticale suino, nella zona di interesse, presentava spessori di circa 4 mm. Questo non permetteva di estrarre provini con gli afferraggi di larghezza maggiore a 5 mm perciò ho deciso di sagomare i provini analogamente a quelli disegnati ma con larghezza del tratto calibrato ridotta. Questa condizione è più critica di quella pianificata. Inoltre la possibilità di realizzare provini di larghezza ridotta da 4 mm a 3 mm potrebbe essere utile qualora lo spessore della parete di tessuto osseo corticale dei femori umani, selezionati per lo studio, fosse inferiore a 5 mm nella zona di interesse. Per rendere ciò possibile ho modificato il percorso utensile nella fase di sagomatura di provini ed ho realizzato un ulteriore supporto, caratterizzato da una larghezza ridotta del tratto calibrato, per la fase di levigatura dl provino. Per disporre di un numero maggiore di provini destinati a test preliminari ho inoltre realizzato provini in PVC e in lega di alluminio EN AW 6082

eseguendo la sola fase di sagomatura dei provini su lamine di spessore 1 mm (Figura 2.10).

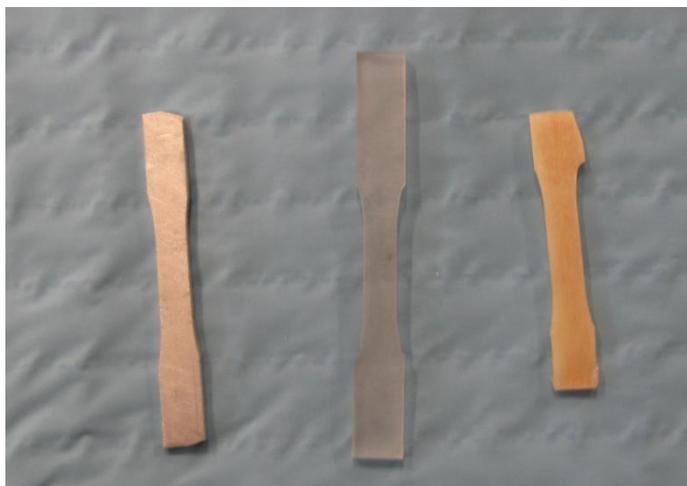


Figura 2.10 – provini realizzati per le prove preliminari in alluminio, plexiglass e tessuto osseo corticale suino

CAPITOLO 3

PROGETTO DEI SISTEMI DI APPLICAZIONE DEL CARICO E DI MISURA

3.1 INTRODUZIONE

Successivamente ho realizzato l'attrezzatura necessaria per l'esecuzione della prova sperimentale. In particolare è necessario che tale attrezzatura soddisfi due requisiti:

- deve essere in grado di sollecitare il provino rispettando le specifiche di carico richieste nella fase di progettazione della prova;
- deve permettere l'applicazione sul provino di uno o più sistemi di misura, i quali permetteranno di determinare le proprietà meccaniche del materiale.

Nei paragrafi seguenti analizzerò le problematiche affrontate e le scelte effettuate per realizzare il sistema di applicazione del carico, per mezzo di un attuatore oleodinamico, al provino. La necessità di realizzare una nuova attrezzatura per l'applicazione del carico è dettata dal fatto che:

- la cella di carico idonea all'esecuzione delle prove è installabile solo su una macchina di prova;
- per tale macchina di prova non erano disponibili sistemi di applicazione del carico adeguati alle piccole dimensioni del provino.

3.2 PROGETTO DEL MODELLO SPERIMENTALE PER L'APPLICAZIONE DEL CARICO

Il problema principale che ho dovuto affrontare nella fase di progettazione dell'attrezzatura capace di sollecitare il provino riguardava la precisione con cui il provino doveva essere allineato con la direzione di applicazione del carico. Tale vincolo deriva dalle piccole dimensioni del provino. Questo comporta che anche piccoli

disallineamenti tra l'afferraggio superiore e quello inferiore comporterebbero disallineamenti o inclinazioni della direzione di carico rispetto all'asse longitudinale del provino in grado di generare momenti flettenti critici per la prova in esame. Quanto descritto deriva da due considerazioni:

- l'applicazione di un momento flettente al provino ne provocherebbe la rottura con uno stato di sollecitazione differente da quello di progetto;
- l'applicazione indesiderata e non controllata di un momento flettente al provino falserebbe i valori delle proprietà meccaniche i quali si ipotizzano ottenuti con lo scenario di carico progettato.

Per ovviare a tali inconvenienti ho deciso che l'applicazione del carico al provino debba avvenire per mezzo di due carrelli a ricircolo di sfere (HIWIN MGH9) di dimensioni 20x29 mm scorrevoli su una guida lineare (HIWIN 03901-1044), i quali verranno successivamente dotati di due morsetti per afferrare il provino alle due estremità (Figura 3.1). La scelta dell'utilizzo di due carrelli scorrevoli su una guida lineare assicura in qualsiasi caso l'allineamento dei carrelli con l'asse longitudinale della guida. In questo modo allineando l'asse longitudinale del provino con l'asse longitudinale della guida, per mezzo di opportuni sistemi che verranno montati sui due carrelli, sarà assicurato l'allineamento con la direzione del carico, il quale sarà trasmesso alla guida dall'attuatore oleodinamico. In tal modo si controlla il posizionamento del provino e si riducono eventuali errori generati dal suo disallineamento rispetto alla direzione del carico. L'uso di questa attrezzatura semplifica anche il montaggio sulla macchina in quanto l'attuatore è di grandi dimensioni con conseguenti difficoltà nel controllare l'allineamento di un provino di piccole dimensioni. L'uso della guida non influenza il carico applicato in quanto la forza necessaria per far traslare il carrello sulla guida è minore di 0.5 N quindi trascurabile.

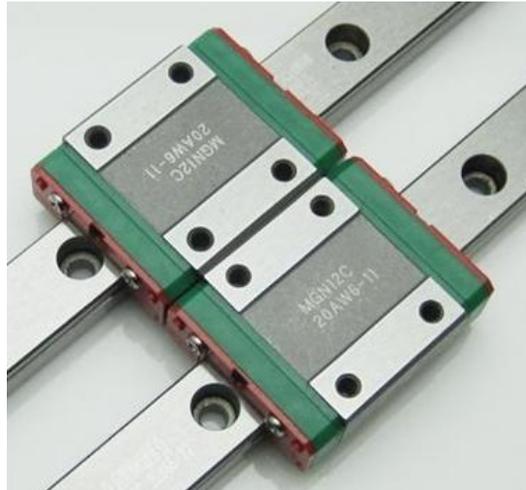


Figura 3.1 – i due carrelli che verranno posizionati su un'unica guida lineare

3.3 PIANIFICAZIONE DEL POSIZIONAMENTO DEL PROVINO ED APPLICAZIONE DEI SISTEMI DI MISURA

La scelta progettuale successiva riguarda l'orientazione spaziale del provino una volta che questo è fissato al sistema di applicazione del carico. A tal proposito si presentano due possibilità:

- provino posizionato con le superfici sagomate parallele alla superficie passante per i carrelli;
- provino posizionato con le superfici sagomate trasversali alla superficie passante per i carrelli.

Tale scelta risulta fondamentale anche per il successivo posizionamento sul provino dei trasduttori per la misura delle deformazioni. La misura delle proprietà meccaniche avverrà tramite la misura delle deformazioni del provino nel corso della prova. Per il mio studio ho previsto l'utilizzo di due sistemi di misura delle deformazioni:

- sistema meccanico mediante un estensometro attaccato direttamente al provino;
- sistema ottico basato sulla tecnica a correlazione digitale di immagine.

Per quanto riguarda la misura con sistema meccanico ho deciso che l'estensometro dovrà essere posizionato nel tratto calibrato del provino sulla superficie avente larghezza 4 mm. Infatti essendo l'estensometro reso solidale al provino per mezzo di elastici, l'appoggio delle estremità dei bracci su un lato di 4 mm sollecita meno il tessuto osseo in termini di

pressione di contatto, a parità di forza applicata, rispetto all'appoggio sul lato da 1 mm. Inoltre l'appoggio su una dimensione di 4 mm risulta più stabile rispetto all'appoggio su un lato da 1 mm. È quindi evidente come vi sia un legame molto stretto tra l'orientamento del provino e il posizionamento dei sistemi di misura, in particolare quello meccanico. In un primo momento avevo optato per un montaggio del provino, con le superfici sagomate parallele alla superficie passante per i carrelli. Utilizzando tale configurazione è possibile infatti applicare l'estensometro alla superficie desiderata facendo passare gli elastici dietro alla guida senza che questi abbraccino il provino. Da prove sperimentali effettuate in laboratorio però ho verificato come l'estensometro risulti ben fissato alla superficie del provino, cioè non sia soggetto a macroscopici scivolamenti dei bracci rispetto alla superficie, quando su ogni braccio sia applicata una forza pari ad almeno 1 N. Ipotizzando che negli afferraggi il provino sia vincolato con un incastro, la struttura risulta caricata come mostrato nella figura seguente (Figura 3.2), supponendo di posizionare l'estensometro in mezzzeria con distanza tra i bracci nota pari a 8.75 mm.

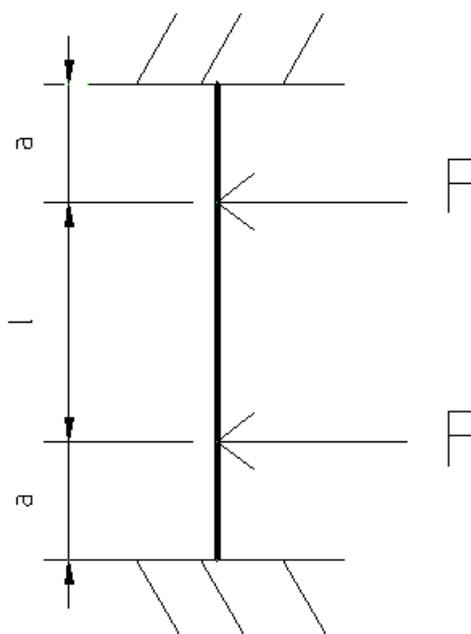


Figura 3.2 – modello della struttura caricata

Dove a vale circa 5.5 mm mentre l è pari alla distanza tra i bracci dell'estensometro nella parte a contatto con il provino quindi 8.75 mm. Utilizzando il principio di sovrapposizione degli effetti, per tale struttura si ottiene un momento flettente massimo in prossimità degli incastri pari, in valore assoluto, a:

$$M_f = \frac{F[a(a+l)^2 + a^2(a+l)]}{(2a+l)^2} = 4 \text{ Nmm}$$

Indicando con s lo spessore e con b la larghezza del tratto calibrato, nel caso in esame il modulo di resistenza a flessione vale:

$$W_f = \frac{bs^2}{6} = 0.67 \text{ mm}^3$$

Da cui si ricava un valore della tensione massima nell'incastro pari a:

$$\sigma_{max} = \frac{M_f}{W_f} = 6 \text{ MPa}$$

Tale valore risulta inaccettabile se si considera che il tessuto osseo presenta un carico di rottura generalmente compreso tra 100 e 200 MPa (Cfr. 1.7). Infatti nelle zone maggiormente sollecitate dall'estensometro si otterrebbero errori fino al 6% circa. Per tale motivo ho deciso di optare per la soluzione caratterizzata dall'orientazione delle superfici sagomate posizionate trasversalmente alla superficie passante per i carrelli. Utilizzando tale orientazione del provino è possibile ovviare al problema sopra esposto posizionando due estensometri alla stessa quota longitudinale in modo che gli elastici pongano in tiro i due estensometri tra loro. In tal modo la struttura (Figura 3.3) non risulta sollecitata a flessione.

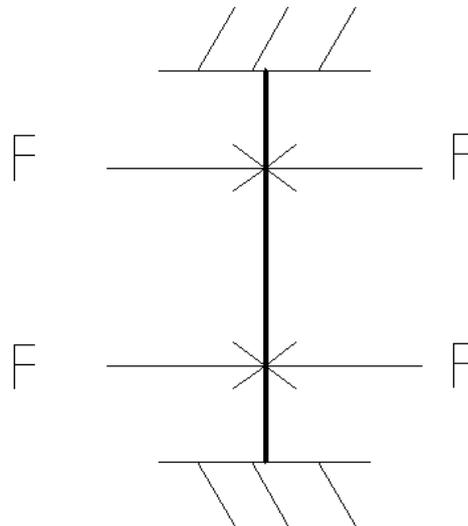


Figura 3.3 – modello della struttura caricata nel caso del doppio estensometro

Tale configurazione presenta anche ulteriori vantaggi in quanto:

- nella configurazione con un unico estensometro si perderebbero le informazioni relative alla deformazione in caso di scivolamento accidentale dei bracci rispetto alla superficie del provino. Con il doppio estensometro aumenta l'affidabilità in quanto la perdita di informazioni avverrebbe qualora entrambi gli strumenti fossero soggetti a scivolamento;

- in caso di esito positivo per ogni provino si avranno a disposizione due misure di deformazione che permetteranno di verificare se il provino è sollecitato a trazione pura.

Essendo le due superfici sagomate occupate dall'estensometro, rimane solo una superficie utilizzabile per le acquisizioni con il sistema di misura ottico. Tale superficie risulta essere quella frontale caratterizzata da uno spessore di 1 mm. La superficie opposta non è invece utilizzabile in quanto non risulta visibile a causa della presenza della guida lineare.

3.4 REALIZZAZIONE DEI SISTEMI DI AFFERRAGGIO DEL PROVINO

Definita l'orientazione del provino e la posizione dei sistemi di misura, la fase successiva riguarda il disegno e la realizzazione dei sistemi di afferraggio delle estremità del provino. L'utilizzo della presenza della guida lineare fa sì che tali afferraggi dovranno essere solidali con i due carrelli. In fase di progetto dovranno venir soddisfatti i seguenti requisiti per ciascun afferraggio:

1. il provino dovrà essere posizionato con le superfici sagomate trasversali alla superficie passante per i carrelli;
2. su ciascuno dei due afferraggi dovrà essere presente una superficie su cui andrà in battuta il provino. Per assicurare l'allineamento della direzione del carico con l'asse longitudinale del provino sarà necessario che tali superfici risultino parallele alla direzione di scorrimento dei carrelli, ossia della guida lineare;
3. dovrà essere presente una superficie mobile in grado di stringere e liberare le estremità del provino;
4. le superfici a contatto con il provino dovranno avere un coefficiente di attrito tale da non permettere lo scivolamento del provino durante la prova;
5. sarà necessario un sistema di carico capace di stringere a sufficienza il provino nelle estremità;
6. dovrà essere possibile il posizionamento degli estensometri direttamente sul provino
7. deve essere possibile il collegamento all'attuatore oleodinamico;
8. coassialità dell'asse longitudinale del provino con la direzione di carico.

Il fissaggio degli afferraggi sui carrelli sarà possibile sfruttando i quattro fori filettati M3 presenti su ciascuno di essi. Tali fori risultano posizionati sui vertici di un rettangolo centrato sul carrello con un interasse in direzione longitudinale alla guida di 10 mm e un interasse in direzione trasversale alla guida di 15 mm. Per realizzare il corpo degli afferraggi ho deciso di utilizzare una lega di alluminio EN AW 6082. Ho deciso di utilizzare come grezzo di partenza un componente in alluminio di altezza pari a 20 mm il quale, per mezzo di 8 fori passanti, venga reso solidale ad entrambi i carrelli. Per soddisfare il primo requisito ho deciso di eseguire su tale componente una cava con una fresa a candela di profondità 15 mm e larghezza 5 mm. In questo modo si vengono a creare due superfici, trasversali al piano passante per i carrelli, idonee a fungere da battuta per le estremità del provino. Il secondo requisito viene soddisfatto all'atto di realizzazione della cava. Infatti la lavorazione è stata eseguita con i carrelli montati sulla guida lineare e staffati al piano di una fresatrice CNC. Staffando tale struttura con la guida parallela ad un asse della fresatrice la cava risulterà automaticamente parallela alla direzione della guida lineare. Questo particolare staffaggio è possibile in quanto si manda in battuta una sponda della guida con una delle scanalature, parallela all'asse orizzontale della macchina, presenti sul piano di appoggio della fresatrice. In tale configurazione è stata pianificata anche un'ulteriore lavorazione in grado di troncare trasversalmente l'unico grezzo in modo da separare i due carrelli. Per soddisfare il terzo requisito ho utilizzato una lamina in lega di alluminio EN AW 6082 di spessore 2 mm libera di scorrere tra la superficie del provino e della cava su cui il provino non va in battuta. Le superfici della cava e della lamina a contatto con il provino saranno ricoperte da carta abrasiva a granulometria 1000 in modo da risultare conformi al quarto requisito. La quinta richiesta verrà soddisfatta realizzando in direzione trasversale alle facce sagomate del provino due fori filettati M6 per ogni afferraggio posizionati lungo l'asse longitudinale del provino, seppur esternamente ad esso. L'asse dei fori inoltre dovrà risultare perpendicolare e incidente con l'asse longitudinale del provino. Su questi fori andranno ad impegnarsi due componenti filettati in grado di spingere sulla lamina e di bloccare quindi le estremità del provino tra questa e la superficie della cava. Per permettere il montaggio degli estensometri sono necessari due accorgimenti:

- nell'afferraggio superiore saranno necessari due scassi sulle superfici laterali della struttura in modo che queste non risultino un ostacolo per il perno verticale dell'estensometro;

- l'elemento filettato prossimo al provino presente nell'afferraggio superiore non dovrà costituire un intralcio per il perno sopra citato. Per tale motivo utilizzerò un grano opportunamente ribassato.

La possibilità di collegamento con l'attuatore oleodinamico avverrà realizzando un foro passante, esternamente alle due viti, su cui sia possibile inserire un perno (Figura 3.4).

L'ultimo fondamentale requisito verrà soddisfatto all'atto pratico del montaggio del provino. Infatti realizzerò un piccolo componente calibrato il quale appoggiandosi sulla guida fornirà un appoggio parallelo a quest'ultima sul quale andrà in battuta il lato di spessore 1 mm (Figura 3.5). Tale superficie e quella della cava su cui va in battuta il provino garantiscono la coassialità dell'asse longitudinale del provino con la direzione di carico identificata dalla direzione di scorrimento dei carrelli. Il sistema di afferraggi progettato avrà inoltre le seguenti caratteristiche:

- gli elementi filettati saranno costituiti da dei grani. Infatti il minor ingombro dei grani rispetto alle viti a brugola permette il posizionamento dei sistemi di misura meccanici delle deformazioni;
- l'afferraggio superiore risulterà più lungo rispetto a quello inferiore di 10 mm così da poter realizzare il foro per il perno. Tale foro sarà presente anche sulla lamina dell'afferraggio superiore;
- il foro necessario per inserire il perno avrà l'asse perpendicolare e incidente con l'asse longitudinale del provino;
- la cava sarà posizionata in modo che il provino una volta fissato risulti centrato rispetto alla guida lineare;
- nel volume compreso tra le superfici a contatto con il provino sarà necessario interporre un elemento di spessore 1 mm in modo che la lamina non si inclini durante il serraggio dei componenti filettati.

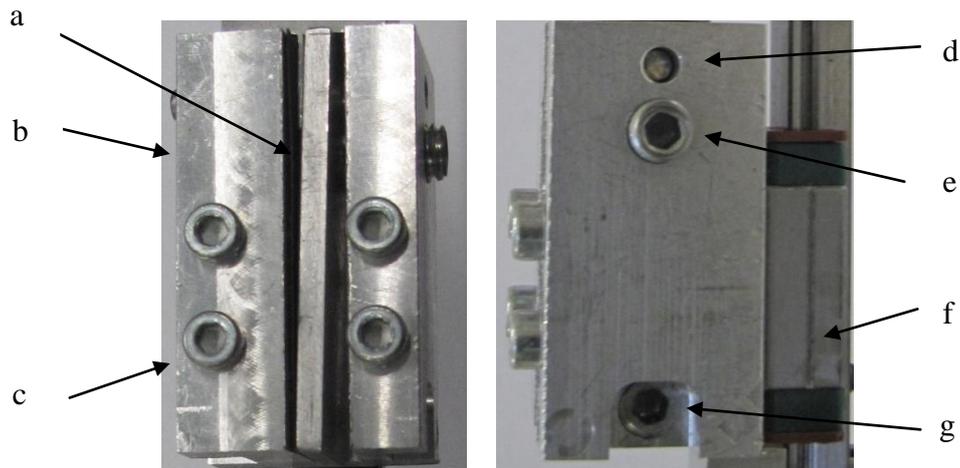


Figura 3.4 – l'afferraggio superiore

(a) lamina; (b) corpo centrale; (c) viti M3 di fissaggio del corpo al carrello; (d) perno;
 (e) grano serraggio provino; (f) carrello scorrevole sulla guida; (g) grano ribassato e
 scasso

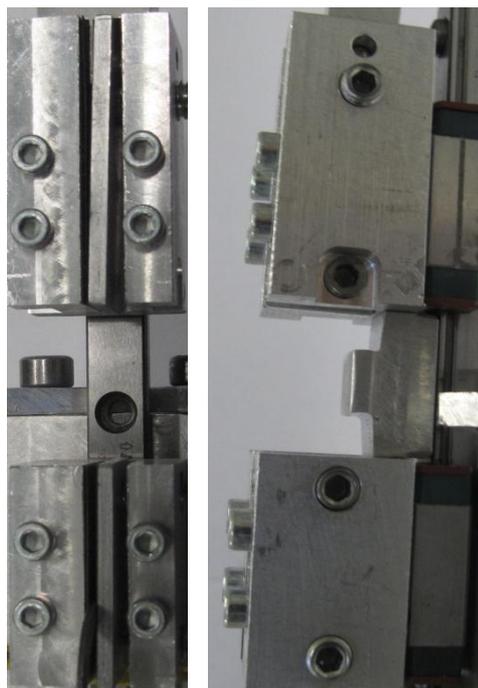


Figura 3.5 – vista frontale e laterale dei due afferraggi, nella vista di destra si può notare
 tra i due carrelli il componente che permette l'allineamento del provino nella fase di
 montaggio

3.5 COLLEGAMENTO CON LA MACCHINA DI PROVA

L'ultima fase relativa alla progettazione del sistema di carico del provino riguarda il collegamento della guida lineare e dei due carrelli con la macchina di prova. In particolare questa fase è caratterizzata da due necessità:

- collegamento con la cella di carico nella parte inferiore;
- bloccaggio del carrello inferiore;
- collegamento con l'attuatore oleodinamico nella parte superiore.

Per quanto riguarda il fissaggio alla cella di carico non sono presenti particolari vincoli. Sfrutterò tre fori presenti sull'asse longitudinale della guida in modo da renderla solidale ad un supporto in lega di alluminio EN AW 6082, avente la superficie di appoggio perpendicolare alle superfici verticali, per mezzo di tre viti M3. Su tale supporto sarà eseguita una cava di profondità 0.1 mm e di larghezza pari alla larghezza della guida. Essendo questa ottenuta con una fresatrice CNC, dopo aver allineato il supporto agli assi della macchina, è garantita la perpendicolarità della guida rispetto al piano di appoggio. La profondità della cava di 0.1 mm permette l'inserimento e il riferimento della guida senza ostacolare il moto dei carrelli. Tale supporto permetterà poi lo staffaggio con la cella di carico per mezzo di una traversa alla quale saranno applicate due forze verso il basso per mezzo di due viti M8 vincolate alla cella di carico (Figura 3.6). Il bloccaggio del carrello inferiore durante la prova invece avverrà per ostacolo. Sulla parte superiore del supporto infatti posizionerò due componenti prismatici forati al centro i quali, fissati al supporto per mezzo di due viti M5, bloccheranno il carrello inferiore quando questo sarà tirato in direzione verticale dalla catena composta dai due afferraggi e dal provino.

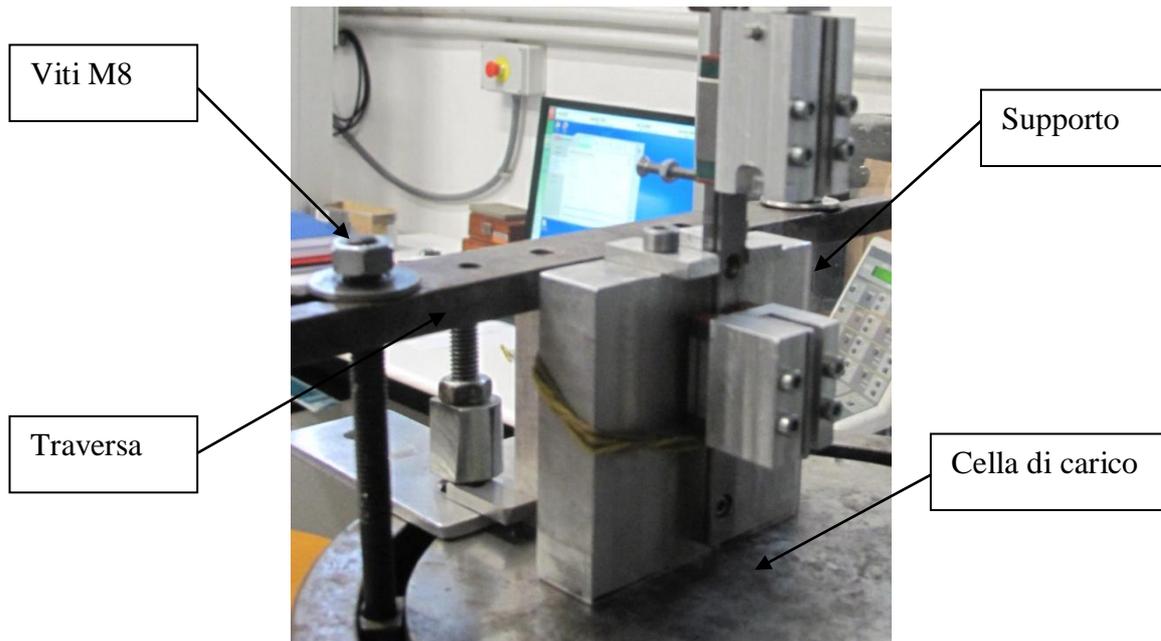


Figura 3.6 – il collegamento con il piano di appoggio della cella di carico

Per il collegamento con l'attuatore il pericolo principale è dato da eventuali disallineamenti tra l'attuatore e la guida derivanti dal fatto che per poter montare agevolmente ogni provino sarà necessario svincolare prima di ogni prova l'intera struttura. Tali disallineamenti infatti:

- impedirebbero il collegamento di questi due elementi;
- solleciterebbero a flessione l'intera struttura.

Per risolvere questo problema collegherò l'attuatore e il carrello superiore per mezzo di un elemento tubolare dotato alle due estremità di uno snodo sferico forato (Figura 3.7). Posizionando gli assi passanti per gli snodi a 90° tra loro infatti si ottiene l'equivalente di un giunto di Cardano in grado di svincolare la struttura da eventuali disallineamenti trasferendo solamente il carico dall'attuatore al carrello. Infatti eventuali momenti flettenti dati dal disallineamento si concentrerebbero sull'elemento tubolare. Il collegamento tra le estremità del giunto, l'attuatore e il carrello avverrà in entrambi i casi per mezzo di due componenti in lega di alluminio EN AW 6082 dotati di una cava nella quale possa entrare lo snodo. Tali componenti disporranno di un foro trasversale alla cava necessario all'inserimento di un perno in grado di renderli solidali allo snodo. Il componente di interfaccia con l'attuatore sarà reso solidale all'estremità di quest'ultimo grazie a due viti M8. Di particolare interesse è invece il componente di collegamento tra il carrello superiore e lo snodo sferico inferiore. Infatti questo dovrà trasmettere il carico al carrello. Tale elemento sarà perciò dotato di una linguetta di spessore 1 mm che andrà a

posizionarsi tra le due superfici dell'afferraggio. In questo modo dopo il serraggio delle viti, per attrito, sarà in grado di trasmettere il carico al carrello superiore. Tale linguetta presenterà anche un foro sul quale andrà ad impegnarsi il perno. Il perno fungerà da elemento di sicurezza qualora l'attrito non fosse sufficiente a trasmettere il carico durante la prova.

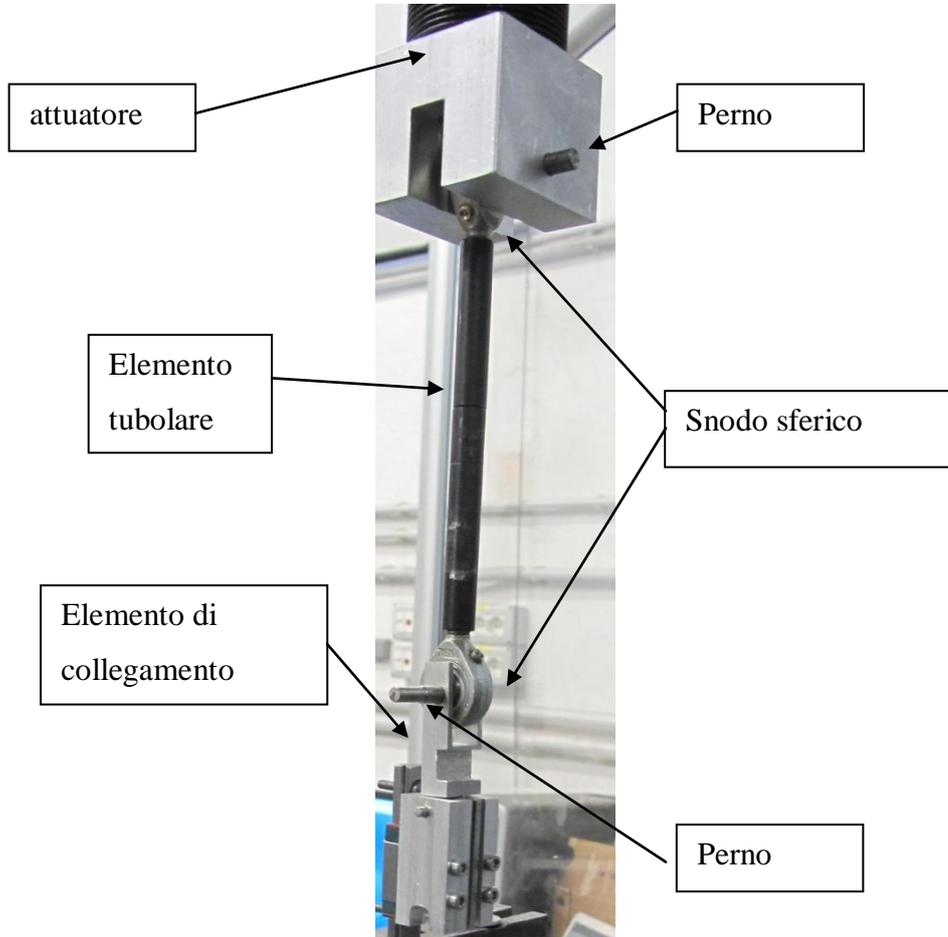


Figura 3.7 – collegamento tra il carrello superiore e l'attuatore

CAPITOLO 4

CARATTERIZZAZIONE MECCANICA DEL TESSUTO OSSEO CORTICALE

4.1 INTRODUZIONE

In questo capitolo descrivo tutte le attività sperimentali da me eseguite presso il Laboratorio di Tecnologia Medica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli. In particolare il mio lavoro si è articolato su due fasi principali: nella prima fase ho eseguito tutte le operazioni necessarie per poter estrarre i provini dai femori. Nella seconda fase i provini sono stati sollecitati a trazione sfruttando il sistema di applicazione del carico realizzato e verificato precedentemente. Al termine di questa fase i provini sono stati studiati mediante l'uso di una micro tomografia computerizzata per determinare la densità del tessuto osseo corticale.

4.2 MATERIALI

Al fine di valutare le caratteristiche meccaniche del tessuto osseo corticale umano ho studiato cinque femori provenienti da donatori di cui riporto le generalità:

NUMERO	SESSO	ETA'	CAUSA DECESSO
1	M	60	ictus
2	M	58	infarto
3	M	67	ictus
4	M	46	Emorragia cerebrale
5	M	67	ictus

Tutti i donatori non erano affetti da patologie del sistema muscolo scheletrico. Lo stato di conservazione dei segmenti ossei era perfetto. Infatti la procedura di estrazione del campione di segmento osseo prevede che il corpo del donatore venga posto, entro le 12 ore successive al decesso, a temperatura controllata (4°C). Entro 96 ore dal decesso, il corpo viene dissezionato ed i campioni anatomici sono posti ad una temperatura inferiore ai -20°C, alla quale resteranno fino al loro utilizzo. Pertanto i campioni di tessuto sono considerati congelati a fresco (*fresh frozen*). La numerosità del campione è stata decisa sulla base del numero di campioni osservabili nella finestra temporale ottenuta per l'uso del sincrotrone. Tali osservazioni, non oggetto del mio lavoro, verranno eseguite esternamente all'Istituto Ortopedico Rizzoli in collaborazione con altri centri di ricerca. Poichè il tempo a disposizione consente un numero massimo di 10 valutazioni della qualità e organizzazione del collagene e necessitando di due valutazioni per ogni femore, una sul lato mediale e una sul lato laterale, tale vincolo limita lo studio a cinque femori.

4.3 ESTRAZIONE DEI PROVINI

Di seguito verranno presentate tutte le fasi operative, pianificate nella fase di disegno dell'esperimento descritta nel capitolo 2, che ho eseguito per estrarre i provini sagomati partendo dal femore intatto. Ciascuna operazione è stata eseguita il più rapidamente possibile per cercare di evitare lo scongelamento del femore e ridurre il tempo di manipolazione dei provini prima della prova.

4.3.1 TRACCIATURA DEI PIANI DI RIFERIMENTO ANATOMICI SULLA DIAFISI

I femori sono stati puliti accuratamente da eventuali residui di tessuti molli (legamenti e tendini) presenti in superficie, mediante l'utilizzo di appositi scalpelli e bisturi in collaborazione con il personale del laboratorio. Successivamente si è proceduto alla tracciatura dei piani di riferimento anatomici seguendo il protocollo (Ruff, 1983; Cristofolini, 1995). Per il tracciamento sulla diafisi si è proceduto posizionando il femore sul piano di riscontro con la faccia anteriore verso l'alto, appoggiato sui condili e sul piccolo trocantere. Si è allineato grossolanamente ad un righello e si è mantenuto in

posizione zavorrandolo con dei pesi. Dopodiché si sono individuate due regioni piatte sulla superficie femorale anteriore sotto la fossa condilare ed all'altezza del piccolo trocantere. In questi punti si è misurato il diametro del femore con il calibro e si è marcato il punto di mezzeria con un pennarello indelebile. Per minimizzare l'errore il punto di mezzeria è stato misurato ed individuato su entrambi i lati del femore. In seguito il femore è stato vincolato con una morsa disegnata per afferrare la diafisi del femore (ItalSigma) e posto con la superficie mediale verso l'alto. La morsa ha tre gradi di libertà e consente di allineare su un piano orizzontale i punti appena identificati. Una volta eseguito l'allineamento si traccia col truschino un piccolo solco che li congiunge sia sul lato anteriore che su quello posteriore il quale corrisponde alla proiezione del piano sagittale sulla diafisi. L'operazione è stata ripetuta con un pennarello indelebile per rendere meglio visibile la tracciatura. Il femore è stato quindi ruotato di 90° per orientare la superficie mediale verso l'alto. Si sono marcati i punti di mezzeria nel piano sagittale, ai medesimi livelli dei punti precedenti. Dopo aver allineato orizzontalmente i due punti di mezzeria si è proceduto alla tracciatura della proiezione del piano frontale con truschino e pennarello indelebile su entrambi i lati.

4.3.2 PRELIEVO DEI CAMPIONI DI TESSUTO PER L'ANALISI DEL COLLAGENE E LA CARATTERIZZAZIONE MECCANICA

Dopo aver tracciato i piani di riferimento sulla diafisi del femore, ho proceduto con l'estrazione di due campioni di tessuto: il primo di lunghezza 15 mm dedicato all'analisi della qualità e organizzazione del collagene; il secondo, di lunghezza pari a 46 mm destinato alle prove di caratterizzazione meccanica del tessuto osseo corticale. Ho ricavato i campioni dalla diafisi del femore sotto al piccolo trocantere grazie all'utilizzo di una troncatrice metallografica (Remet) dotata di disco diamantato. Inizialmente ho posizionato sulla macchina il femore e ho allineato, per mezzo di un truschino con quota fissa in battuta sul piano della macchina, una delle quattro tracciature eseguite precedentemente con il piano della troncatrice. Ora, dopo aver fissato il femore, ho allineato la lama al piccolo trocantere agendo su una vite micrometrica solidale al piano a cui è fissato il femore. Grazie all'allineamento del femore eseguito precedentemente, la lama risulta perpendicolare ai piani di tracciatura e quindi all'asse longitudinale del femore. A questo punto ho spostato, agendo sulla vite micrometrica, il piano di taglio di

15 mm verso i condili ed ho eseguito il primo taglio. Analogamente ho spostato ulteriormente di 17 mm il piano di taglio verso i condili ed ho eseguito il secondo taglio ottenendo il primo campione.

Essendo il disco diamantato caratterizzata da uno spessore di 2 mm, tale procedura permette l'estrazione di un campione di tessuto di spessore pari a 15 mm. In una fase dello studio non relativa alla caratterizzazione meccanica del tessuto osseo corticale, tale campione di osso è stato processato dal personale del laboratorio in modo da ottenere delle sottili sezioni, trasversali all'asse longitudinale del femore, di spessore pari a 0.1 mm sulla superficie distale. Queste sezioni verranno poi analizzate al sincrotrone per l'analisi della qualità del collagene. Operativamente ho estratto il campione di tessuto destinato alla caratterizzazione meccanica in una fase successiva perciò ho riposto immediatamente in freezer lo spezzone di femore rimasto dopo l'estrazione del campione di tessuto destinato all'analisi del collagene. Per poter estrarre il secondo campione di lunghezza 46 mm ho mandato a battuta la superficie ottenuta dal taglio precedente contro il disco diamantato in modo da garantire il parallelismo tra tale superficie e quella che si otterrà con il taglio successivo. A questo punto ho fissato il femore sulla morsa e con l'ausilio del truschino ho verificato l'allineamento di una delle tracciature con il piano della macchina (Figura 4.1). Ho effettuato uno spostamento con vite micrometrica di 48 mm del piano di taglio verso i condili in modo da ottenere un segmento di femore della lunghezza richiesta di 46 mm. Come ultima operazione ho eseguito il taglio e riposto il campione in freezer dove è stato conservato fino all'operazione successiva.

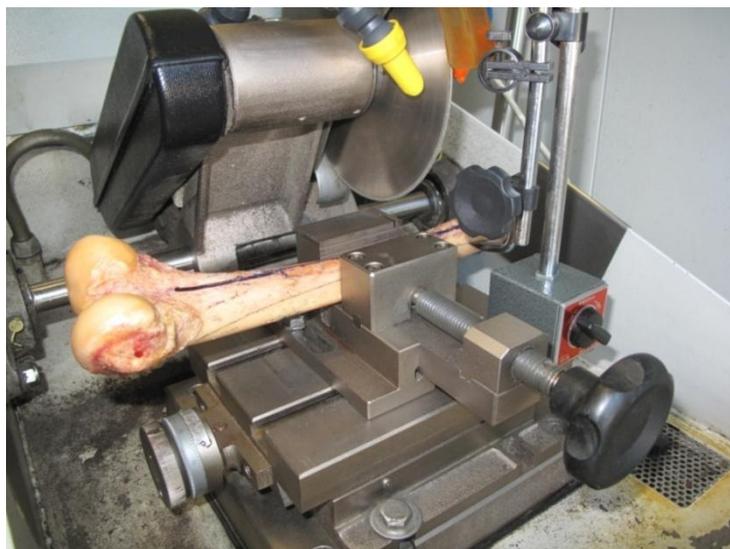


Figura 4.1 – verifica col truschino dell'allineamento del femore fissato in morsa

4.3.3 INCLUSIONE DELL'ESTREMITA' DISTALE

In tale operazione ho realizzato, sul campione di tessuto di lunghezza 46 mm destinato alle prove di caratterizzazione meccanica, un blocco cilindrico necessario per l'esecuzione delle fasi successive. In particolare ho realizzato tale blocco nella parte distale del segmento femorale ottenuto nell'operazione precedente in modo da estrarre i provini in posizione più vicina ai campioni da cui si otterrà una valutazione relativa alla qualità e organizzazione del collagene. In questa fase ho inizialmente eseguito tre scassi trasversali vicino all'estremità distale del segmento osseo per migliorare la presa della resina. Successivamente ho posizionato il provino su un piano di riscontro in appoggio sulla superficie di taglio distale, all'interno di un settore circolare in PVC di altezza 10 mm, diametro interno 60 mm e diametro esterno 70 mm (Figura 4.2). Ho ottenuto tale componente partendo da un tubo ed eseguendo varie troncature successive al tornio.



Figura 4.2 – posizionamento del segmento osseo all'interno del settore circolare in PVC sul piano di riscontro

Ora, dopo aver applicato dei pesi sul provino e sul settore circolare in modo da assicurare l'appoggio con il piano di riscontro, ho verificato con una squadra metallica la perpendicolarità delle tracciature dei piani di riferimento con il piano di riscontro. Soddisfatta questa verifica ho riempito, con l'ausilio di una siringa da 50 cc, il volume libero compreso tra il provino e il settore circolare di PVC con resina acrilica (polimetilmetacrilato, PMMA) con dosaggio in peso pari a 70% polvere e 30% monomero (Figura 4.3). Il processo di polimerizzazione, della durata di 20 minuti circa,

viene eseguito sotto cappa chimica per evitare l'inalazione del monomero che si libera durante la reazione. Al termine della polimerizzazione ho rimosso i pesi e ho distaccato il provino, incluso nel PMMA dal piano di appoggio. I tre scassi trasversali eseguiti precedentemente garantiscono l'ancoraggio meccanico del campione di tessuto.

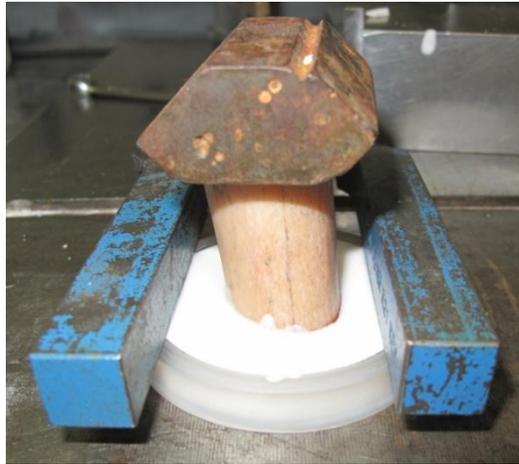


Figura 4.3 – inclusione del segmento osseo nel PMMA con l'ausilio di pesi per l'appoggio sul piano di riscontro

4.3.4 ESECUZIONE DEI TAGLI PARALLELI

Dopo aver incluso il segmento osseo nel PMMA, ho provveduto a ricavare da quest'ultimo i grezzi di partenza per la successiva sagomatura del provino utilizzando la sega a nastro (Exakt). Per maggior chiarezza definisco le direzioni di taglio: con direzione Y si intendono gli spostamenti in profondità regolati con la vite micrometrica mentre con direzione X si intende la direzione di avvicinamento alla lama possibile per mezzo della guida (Figura 4.4).

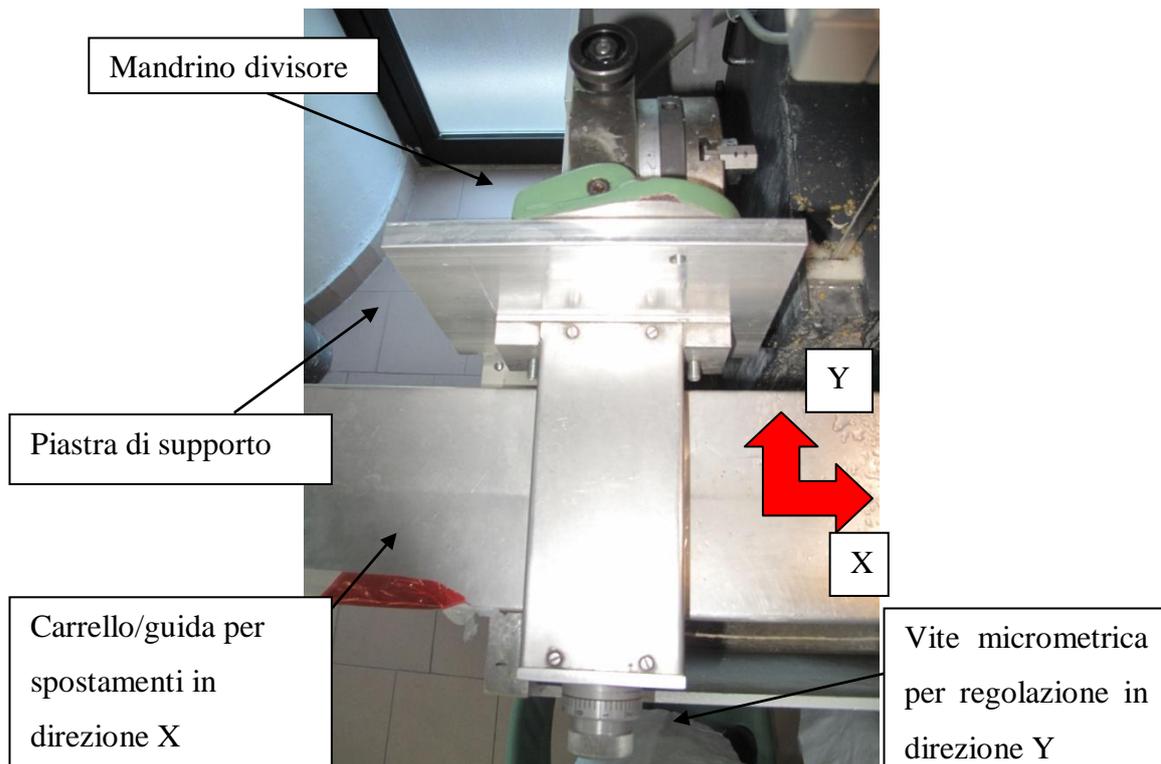


Figura 4.4 – il setup montato in macchina e indicazione delle direzioni di taglio

Per la realizzazione dei tagli paralleli ho fissato il segmento osseo al mandrino per mezzo del settore circolare in PVC. Ora ho ruotato il mandrino, solidale alla guida della sega a nastro, attorno all'asse passante per le due cerniere in modo da rendere la superficie prossimale del segmento osseo incidente con la lama diamantata (Figura 4.5).



Figura 4.5 – il segmento osseo afferrato dal mandrino divisore

Agendo sulla rotazione di 360° rispetto all'asse del mandrino e sulla regolazione di profondità possibile per mezzo della vite micrometrica ho allineato le tracciatore del lato mediale e di quello laterale con la lama. In particolare ho posizionato il lato mediale superiormente. A questo punto l'obiettivo è ottenere 4 segmenti di spessore 1.1 mm e lunghezza 35 mm, centrati sia in posizione mediale che laterale, che fungeranno da grezzo di partenza per la realizzazione dei provini. Considerando che la lama ha spessore 0.8 mm ho perciò arretrato, agendo sulla vite micrometrica, il divisore per 3.8 mm in direzione Y ed ho eseguito il primo taglio longitudinalmente al segmento osseo (in direzione X) fino al livello del blocco cilindrico. L'avanzamento con velocità costante avviene per gravità tramite l'applicazione di pesi agenti sul carrello. La lubrificazione del taglio è resa possibile da un ricircolo di acqua capace di mantenere sempre bagnato il segmento osseo nella zona di taglio. Terminato il taglio ho arretrato il carrello in direzione X, ho regolato un avanzamento di 1.9 mm in direzione Y ed ho eseguito il taglio successivo. Per ottenere 4 lamine di tessuto osseo corticale ho eseguito analogamente altri tre tagli.

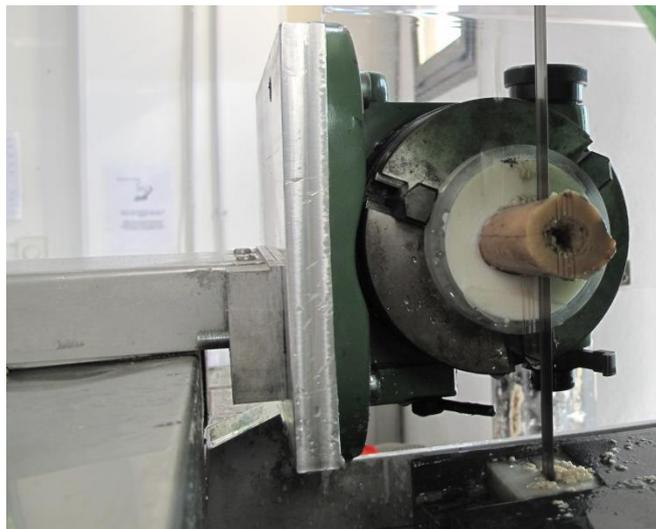


Figura 4.6 – il provino nella fase di taglio

In questa condizione le lamine sono ancora solidali alla base del segmento osseo incluso nel PMMA. Per eseguire la troncatura ho ruotato il mandrino divisore di 90° in senso antiorario rispetto all'asse passante per le due cerniere. A questo punto ho marcato le lamine con un pennarello in modo da non perdere l'informazione relativa alla posizione spaziale di ciascuna di esse (Figura 4.7).

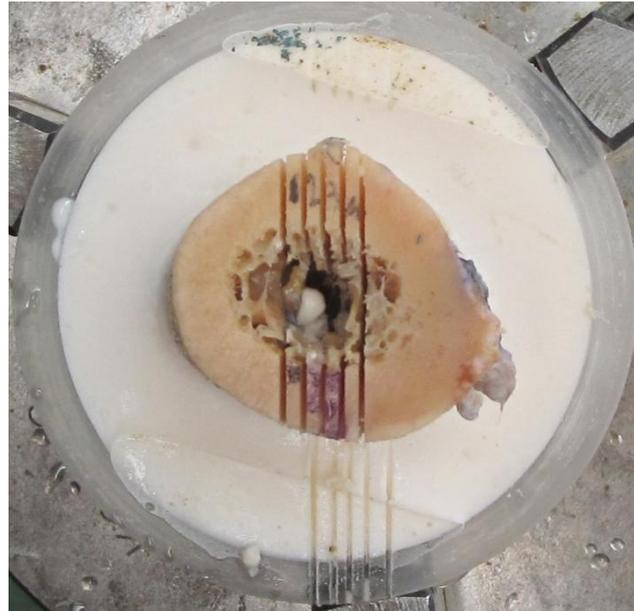


Figura 4.7 – i provini con la relativa marcatura prima della fase di troncatura

Ora ho arretrato il mandrino divisore in direzione Y in modo che la lama risultasse a filo con la superficie del blocco cilindrico ed ho eseguito la troncatura dei futuri provini movimentando il carrello in direzione X (Figura 4.8). Ho quindi raccolto i provini troncati e li ho riposti nel freezer ciascuno in una provetta. L'ultima delle quattro lamine estratte da ogni lato non sarà destinata alla caratterizzazione meccanica del tessuto osseo ma sarà destinata ad altri studi

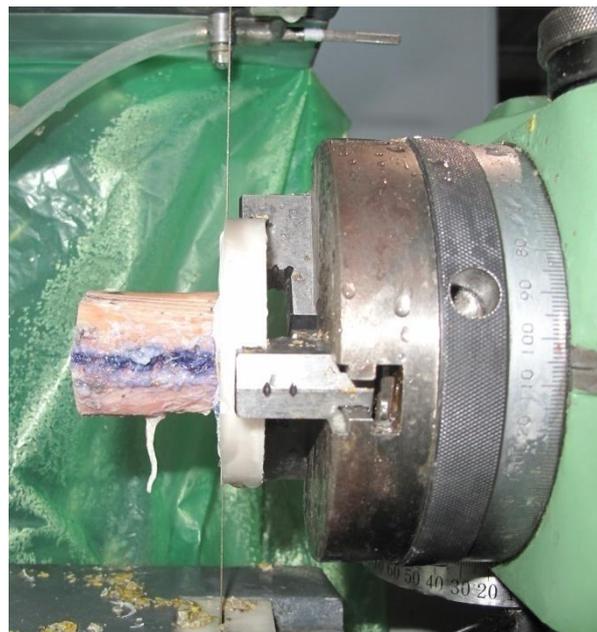


Figura 4.8 – il segmento osseo posizionato per la troncatura dei provini

4.3.5 SAGOMATURA DEI PROVINI

In questa fase ho eseguito le operazioni necessarie per sagomare i provini provenienti dalle operazioni precedenti. In particolare ho eseguito tale sagomatura per mezzo di una fresa CNC (ProLight) su cui ho montato una fresa diamantata di diametro 3 mm. Per il posizionamento in macchina del provino ho utilizzato l'attrezzatura da me realizzata in laboratorio (Cfr. 2.5.5) fissata al piano della fresa allineata all'asse orizzontale della macchina.



Figura 4.9 – due viste del provino ottenuto dalle operazioni precedenti e pronto per le lavorazioni alla fresa CNC

Ora, dopo aver carteggiato con carta abrasiva granulometria 400 i due lati lunghi di spessore 1 mm, ho montato il provino sul supporto realizzato. Per fare questo ho alzato la barra, ed ho posizionato il provino centrato in direzione orizzontale sul castello in battuta contro le due torrette con la superficie esterna dell'osso appena carteggiata. Successivamente ho abbassato la barra fino al contatto con il provino ed ho stretto i quattro dadi M2.5 per bloccarlo. Completato il serraggio ho riempito lo scasso con soluzione salina in modo da mantenere idratato il provino (Figura 4.10).

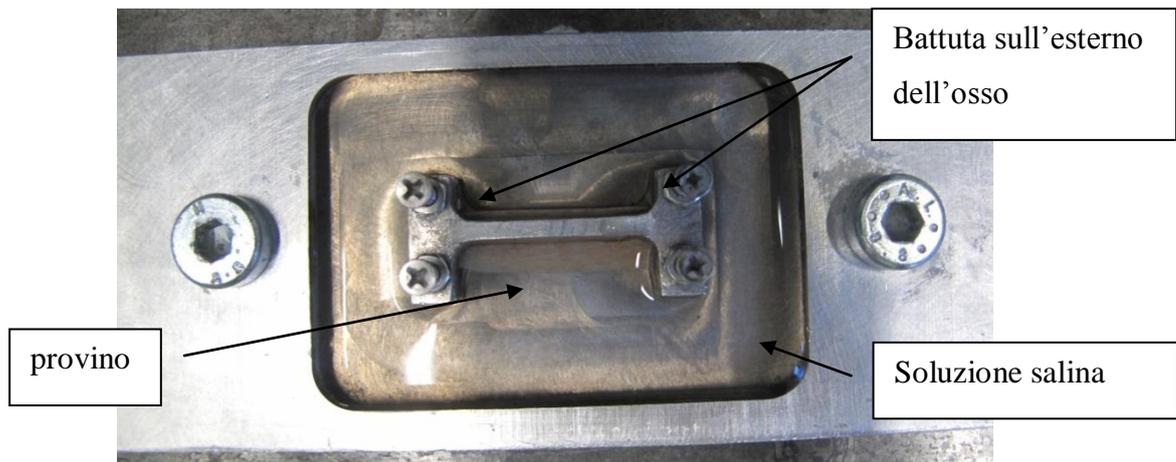


Figura 4.10 – il provino montato sull'attrezzatura per le lavorazioni CNC immerso in soluzione salina

Il provino così posizionato viene sagomato per mezzo della fresa diamantata di diametro 3 mm con percorso utensile identico per ogni provino. Le inomogeneità nello spessore del tessuto osseo corticale fanno sì che ciascun provino sia diverso perciò per uniformare la sagomatura del provino, in analogia con le dimensioni caratteristiche del provino (Cfr. 2.4), ho deciso di asportare sempre 0.7 mm dalla parte in cui il provino va in battuta. Essendo il tratto calibrato di larghezza 4 mm, sull'altro lato viene automaticamente asportato tutto il tessuto necessario alla realizzazione corretta del tratto calibrato. Questo è possibile in quanto ho verificato che ogni provino presenta uno spessore del tessuto osseo corticale maggiore di 5.5 mm. Quindi asportare 0.7 mm invece di 0.5 mm non pregiudica la sagomatura. In tal modo il tratto calibrato, zona fondamentale del provino, risulta sempre posizionato ugualmente su tutti i provini nonostante le differenze anatomiche della diafisi, eventualmente a discapito di una asimmetria, non problematica, negli afferraggi. La sagomatura avviene in una sola passata in quanto tutto lo spessore di 1.1 mm viene lavorato dall'utensile la cui altezza della zona diamantata è 5 mm. In particolare la fresa lavora con la superficie inferiore sotto al provino per 0.5 mm. Al termine della lavorazione ho immediatamente congelato il provino.

4.3.6 LEVIGATURA

Terminate le lavorazioni precedenti il provino è completo a meno dello spessore che eccede le dimensioni di progetto di 0.1 mm. Per ridurre lo spessore e lucidare le superfici ho levigato entrambi i lati del provino su una macchina levigatrice (Exakt) utilizzando carta abrasiva con granulometria 1200 in modo da eliminare eventuali imperfezioni superficiali derivate dai tagli precedenti. Per la levigatura ho posizionato il provino sul supporto in plexiglass da me realizzato precedentemente e, dopo aver acceso la pompa da vuoto, ho fissato grazie alla depressione generata il supporto al carrello mobile della levigatrice. Ora dopo aver bagnato e posizionato la carta abrasiva sul piatto girevole, ho applicato al carrello i pesi necessari a garantire il contatto tra il provino e la carta abrasiva. A questo punto ho regolato con vite micrometrica lo spessore da asportare ed ho avviato la rotazione, la traslazione e la lubrificazione del provino.

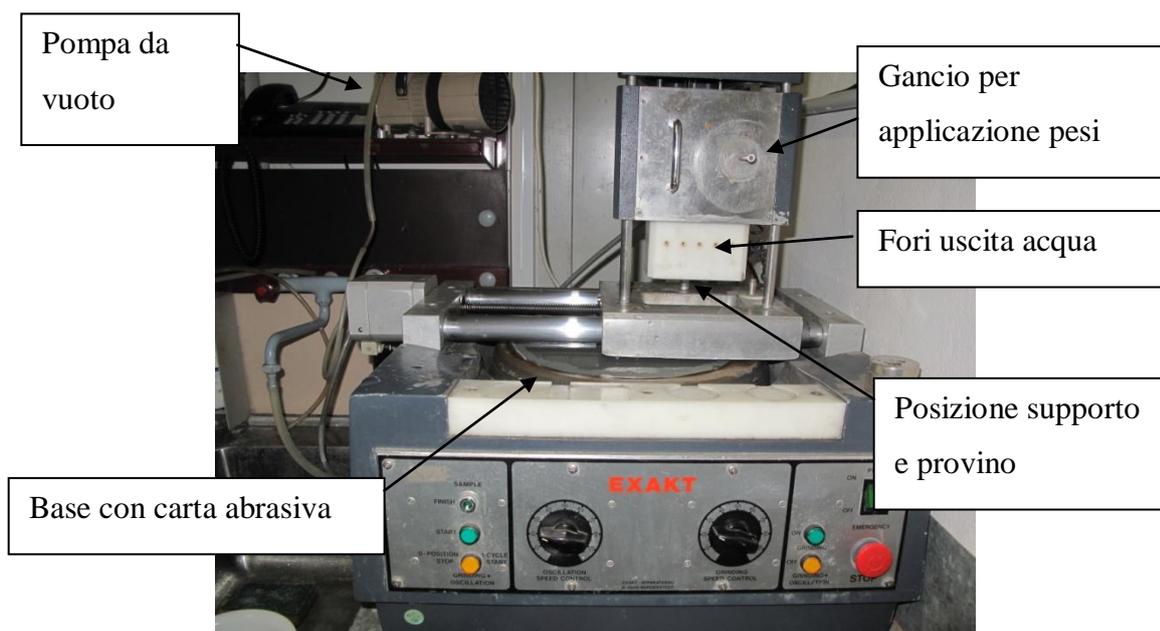


Figura 4.11 – la levigatrice

Ho eseguito tale operazione su entrambe le facce del provino asportando per ogni faccia uno spessore di 0.05 mm. In questo modo il provino presenta entrambe le superfici lucidate ed uno spessore calibrato pari a 1 mm (Figura 4.12).



Figura 4.12 – il provino completato ancora posizionato sul supporto al termine delle operazioni

4.3.7 MISURA DELLE DIMENSIONI DEL PROVINO

Al termine delle lavorazioni ho misurato con calibro centesimale le dimensioni della sezione del tratto calibrato del provino. Ho eseguito sia per lo spessore che per la larghezza tre misure: una al centro e due alle estremità del tratto calibrato. Su 40 provini solo in 26 casi ho riscontrato una differenza massima di 0.01 mm sullo spessore. Nei rimanenti 14 le differenze sullo spessore non erano rilevabili. I valori medi e le relative deviazioni standard sono 0.995 ± 0.059 mm e 3.951 ± 0.025 mm per spessore e larghezza.

4.4 MISURA DELLE DEFORMAZIONI CON CORRELAZIONE DIGITALE DI IMMAGINI

I metodi basati sulla correlazione di immagini digitali (DIC – digital image correlation) consentono di determinare spostamenti e deformazioni su tutta la superficie visibile dalle telecamere del componente oggetto di studio mediante il confronto delle immagini del componente su cui è stata realizzata una distribuzione stocastica di punti, acquisite prima e dopo l'applicazione di un carico. Una volta acquisite le immagini della superficie del provino, ogni immagine viene suddivisa in tante porzioni tipicamente di forma quadrata, formate da aree di $N \times N$ pixel. Le varie porzioni dell'immagine complessiva, definite facet, si sovrappongono le une alle altre [Sutton et al., 2000]. Infatti la distanza tra i baricentri di due facet successive è minore rispetto alla dimensione delle facet. Il grado di sovrapposizione determina la risoluzione della mappa degli spostamenti in quanto il baricentro di ogni facet rappresenta un punto di calcolo. Discretizzate le immagini, ogni facet dell'immagine iniziale viene ricercata nelle immagini della superficie del provino acquisite nel tempo e relative a condizioni di carico differenti, al fine di massimizzare una data funzione di similarità, oppure, analogamente, minimizzare una certa funzione di errore [Ajovalasit, 2009]. Tramite l'analisi della correlazione tra le immagini si riesce a ricostruire il campo degli spostamenti delle facets in cui è stata discretizzata la superficie del provino e di conseguenza, per derivazione, il campo delle deformazioni. L'utilizzo di due videocamere accoppiate permette la visualizzazione stereoscopica dell'oggetto e quindi la misura degli spostamenti nelle tre dimensioni come accennato sopra. Per utilizzare la tecnica a correlazione di immagine è necessario che sulla parte di superficie osservata dell'oggetto in esame sia presente un opportuno pattern, con elevato contrasto e con una distribuzione casuale. La casualità della distribuzione è una caratteristica imprescindibile, perché per ottenere una correlazione tra le varie immagini si deve identificare in modo univoco ogni punto della superficie osservata. Il dispositivo di correlazione presente in laboratorio (ARAMIS 5M, GOM) è dotato di telecamere CCD in bianco e nero (256 livelli di grigio) della risoluzione di 2448x2050 pixel, ovvero 5 Mpixel. Queste possono lavorare ad una frequenza massima di 15 Hz in condizioni standard ma possono arrivare fino a 29 Hz dimezzando la risoluzione. Tale sistema è completo di scheda di acquisizione, sulla quale sono presenti otto canali analogici utilizzati per il collegamento

alla macchina di prova, e di una stazione di lavoro con il *software* di elaborazione (ARAMIS v6.3, GOM). Il *software* permette di gestire tutte le fasi di misura, dalla calibrazione all'acquisizione della sequenza di immagini del provino sollecitato ed infine all'elaborazione, in fase di *post-processing*, dei dati raccolti. E' altresì possibile creare documentazione relativa al progetto o esportare i dati per elaborarli con algoritmi esterni al programma.

4.4.1 CALIBRAZIONE DEL DIC

Per poter utilizzare il DIC è necessaria una calibrazione dei sistemi stereoscopici, che in generale consiste nel misurare con accuratezza i parametri del sistema di fotocamere. Questi dipendono dalla posizione relativa delle due camere, dalle dimensioni del sensore CCD e dalla sua posizione relativa rispetto al centro ottico. Al termine della calibrazione il sistema è in grado di eseguire la trasformazione prospettica fra il sistema dello spazio tridimensionale, ed il sistema di riferimento delle fotocamere, avente origine nel centro ottico ed asse z orientato secondo la normale al piano della lente. In tale modo è possibile risalire alla posizione di un generico punto P nello spazio, conoscendo la posizione che quel punto occupa nelle due immagini stereoscopiche raccolte (GOM, 2009). La calibrazione è un'operazione solitamente eseguita *offline* e necessita di una serie di oggetti contenenti alcuni riferimenti a distanze note e quindi di geometria nota. Registrando la posizione di questi punti noti ed operando la trasformazione inversa tra sistemi di coordinate è possibile stimare i parametri del sistema di acquisizione. Il processo di calibrazione deve essere ripetuto ogni volta che il sistema viene reimpostato, quando vengono cambiate le ottiche del sensore oppure quando le immagini raccolte presentano ampie zone scorrelate. Per effettuare la calibrazione, il costruttore fornisce una serie di pannelli detti *primari di calibrazione* (Figura 4.13), di dimensioni differenti e scelti in funzione della finestra di misura che si intende utilizzare. I primari presentano in superficie un motivo regolare ed alcuni dettagli irregolari, noti con una precisione di almeno un ordine di grandezza superiore a quella con la quale si intendono determinare le distanze nello spazio tridimensionale.

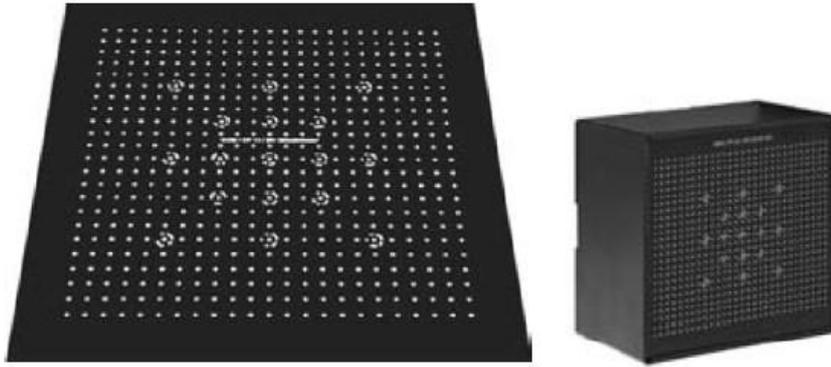


Figura 4.13 – primari di calibrazione

Nel mio caso dovendo osservare una superficie piana di dimensioni teoriche pari a 10x1 mm ho utilizzato il primario di calibrazione di dimensioni 15x12 mm come indicato dal produttore. Quindi, dopo essere entrati nella modalità di calibrazione dal programma di controllo di gestione, occorre disporre il primario in diverse posizioni spaziali ed acquisire ogni volta l'immagine secondo una procedura guidata (Figura 4.14). Al termine della procedura il programma riporta i risultati dell'elaborazione, tra i quali il coefficiente di deviazione. Questo, secondo quanto consigliato da produttore, deve essere compreso fra 0.01 e 0.04 pixel. Il coefficiente di deviazione viene calcolato come la deviazione media delle coordinate di tutti i punti ottenute durante la calibrazione ed esprime l'incertezza sulla posizione di un pixel nell'immagine acquisita.



Figura 4.14 – procedura di calibrazione del sistema ottico

Per poter attuare la procedura di calibrazione direttamente sulla macchina di prova ho utilizzato un supporto, già presente in laboratorio, fissabile all'attuatore della macchina di prova, che supporta il primario di calibrazione nella stessa posizione in cui verrà a trovarsi il provino durante l'acquisizione, e che ne permette l'orientamento secondo protocollo (Figura 4.16). Inoltre, come si può notare dalla procedura di calibrazione (Figura 4.14 Step 2 e 3), è previsto che il sistema di telecamere venga spostato avanti e indietro. Per eseguire queste operazioni in modo preciso e ripetibile, ho utilizzato un sistema di movimentazione, inserito nel cavalletto del sistema DIC, dotato di vite micrometriche digitali (Figura 4.16). Al termine della procedura di calibrazione il software ha fornito i seguenti valori caratteristici del sistema di misura:

- coefficiente di deviazione pari a 0.023 pixel;
- volume di misura di dimensioni 20x15x5 mm.

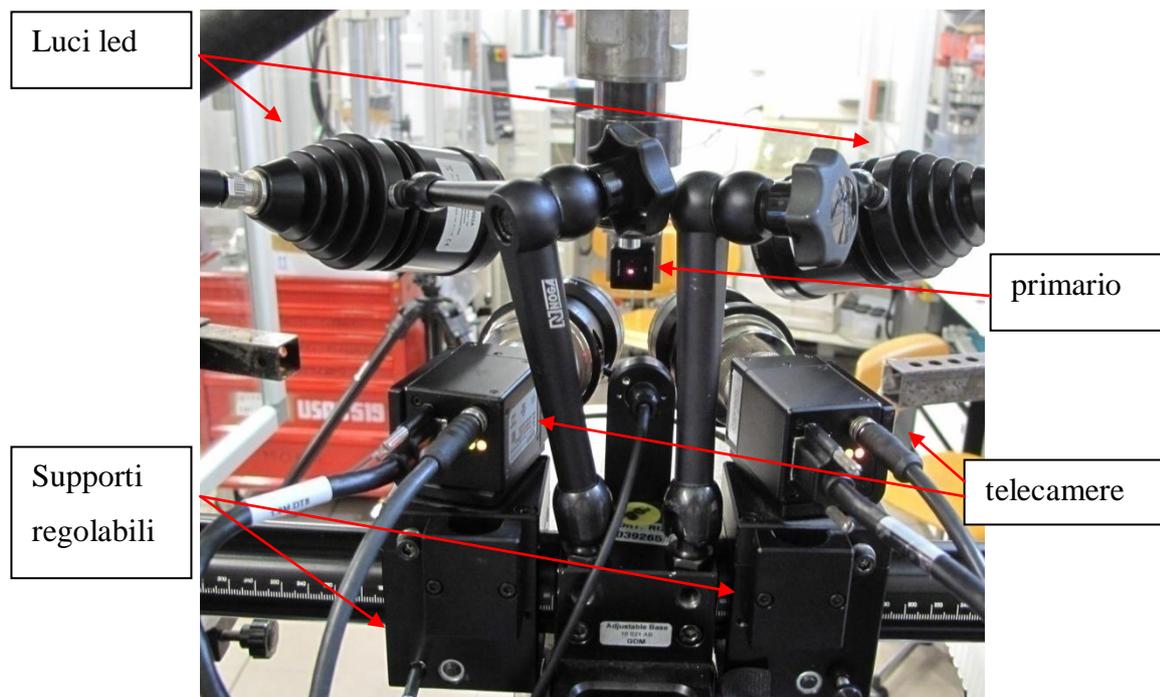


Figura 4.15 – il sistema DIC in fase di calibrazione

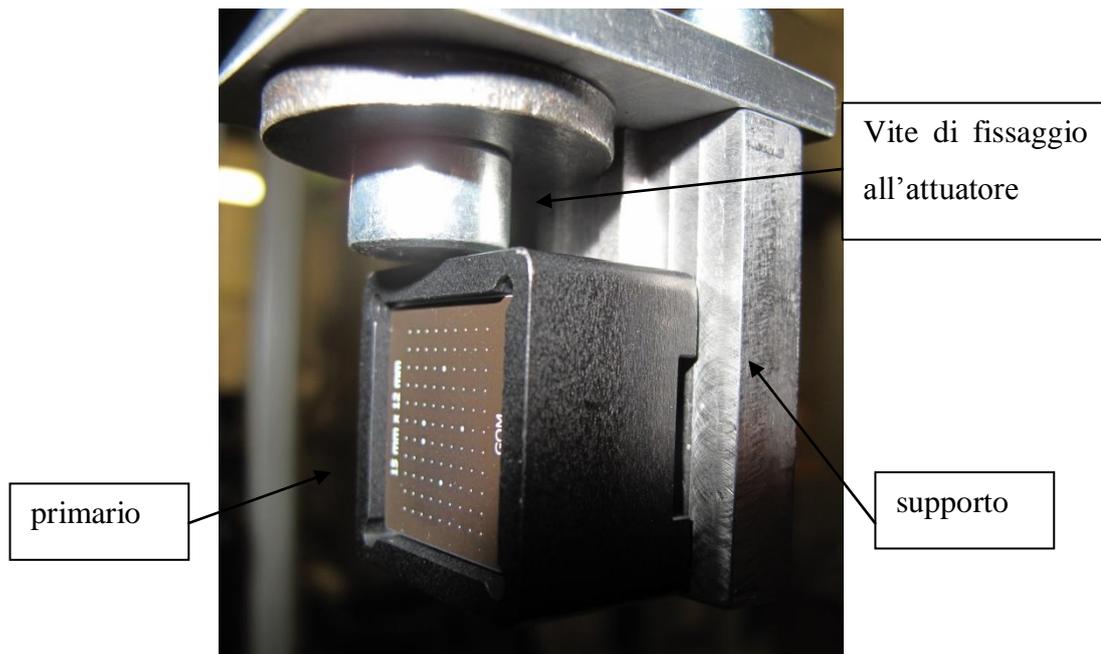


Figura 4.16 – il primario montato magneticamente sul supporto collegato all'attuatore

4.4.2 REALIZZAZIONE DEL PATTERN

Come esposto precedentemente, la misura delle deformazioni con sistema ottico a correlazione digitale di immagine necessita di una adeguata preparazione della superficie da esaminare. In particolare tale pattern deve essere caratterizzato da:

- distribuzione stocastica su tutta la superficie;
- dimensioni degli speckle adeguate alla finestra di misura, coerentemente a quanto indicato dal produttore;
- elevato contrasto tra gli speckle e la superficie di base.

Essendo il tessuto osseo corticale caratterizzato da una colorazione chiara, ho realizzato il pattern ad elevato contrasto unicamente verniciando “a spruzzo” con vernice acrilica nera la superficie in esame di lunghezza 10 mm e spessore 1 mm utilizzando una penna aerografo. La distribuzione stocastica e la dimensione degli speckle derivano dalla regolazione di 5 parametri:

- grado di diluizione della vernice;
- pressione dell'aria erogata alla penna;
- distanza della penna aerografo dalla superficie durante la verniciatura;

- portata di vernice;
- portata d'aria.

Ho scelto questi utilizzando opportuni nomografi redatti in un studio, svolto presso il Laboratorio di Tecnologia Medica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli, atto alla standardizzazione del processo di verniciatura (Lionello, 2013).

4.5 MISURA DELLE DEFORMAZIONI CON TRASDUTTORE MECCANICO

Uno dei sistemi di misura delle deformazioni adottati nel mio studio è quello che prevede l'uso di due estensometri. L'estensometro è un trasduttore dotato di due bracci che, in posizione di riposo, sono a distanza nota. Le estremità dei due bracci sono rese solidali con il provino e permettono di monitorare gli spostamenti relativi tra le due sezioni a cui sono vincolate durante tutto lo svolgimento della prova. Dallo spostamento relativo tra i due bracci è quindi possibile ricavare la deformazione imposta al materiale compreso tra le due sezioni durante la prova. In particolare le estremità dei bracci sono costituite da dei coltelli in grado di garantire un appoggio preciso e puntuale con il provino in modo da evitare scivolamenti e da non perturbare la misura in esame. La forza necessaria a mantenere in contatto i coltelli con il provino è fornita da degli elastici. Come anticipato nel mio studio ho utilizzato due estensometri, montati in contrapposizione, in battuta nel tratto calibrato sui lati da 4 mm del provino. I due estensometri sono identici (INSTRON 2620-601) e sono caratterizzati da un range di misura pari a ± 5 mm con classe di accuratezza 0.5%. La misura della distanza tra i coltelli l'ho eseguita per mezzo di un calibro centesimale ed ha fornito per entrambi gli estensometri il valore di 8.75 mm. Tale valore risulta coerente con il disegno dell'esperimento. Infatti permette il posizionamento degli estensometri all'interno del tratto calibrato del provino, pari a 10 mm.

4.6 POSIZIONAMENTO DEL PROVINO SULL'ATTREZZATURA

Una volta realizzato il pattern, ho posizionato il provino tra gli afferraggi con una pinzetta in modo da non compromettere la verniciatura. Per garantire l'allineamento del provino con la direzione di applicazione del carico ho utilizzato un componente calibrato in alluminio, da me realizzato, che posto in battuta tra i due carrelli fornisce una superficie di appoggio parallela alla guida (figura 4.17). Su tale componente ho appoggiato la superficie calibrata del provino opposta a quella verniciata. Tale componente inoltre è realizzato in modo che, una volta posizionato il provino, gli afferraggi risultino nella posizione corretta per il serraggio del provino, cioè esterni ai raccordi. Preliminarmente ho eseguito una verifica del corretto allineamento del provino utilizzando provini di plexiglass. La verifica ha dimostrato come il provino, una volta allineato e bloccato, presenti disallineamenti dall'asse verticale nel tratto calibrato compresi tra 0.02 mm e 0.03 mm. Tali valori risultano accettabili in quanto comportano un disallineamento dall'asse verticale compreso tra 0.11° e 0.17° . Una volta che il provino è posizionato ho provveduto a bloccare il solo afferraggio superiore.

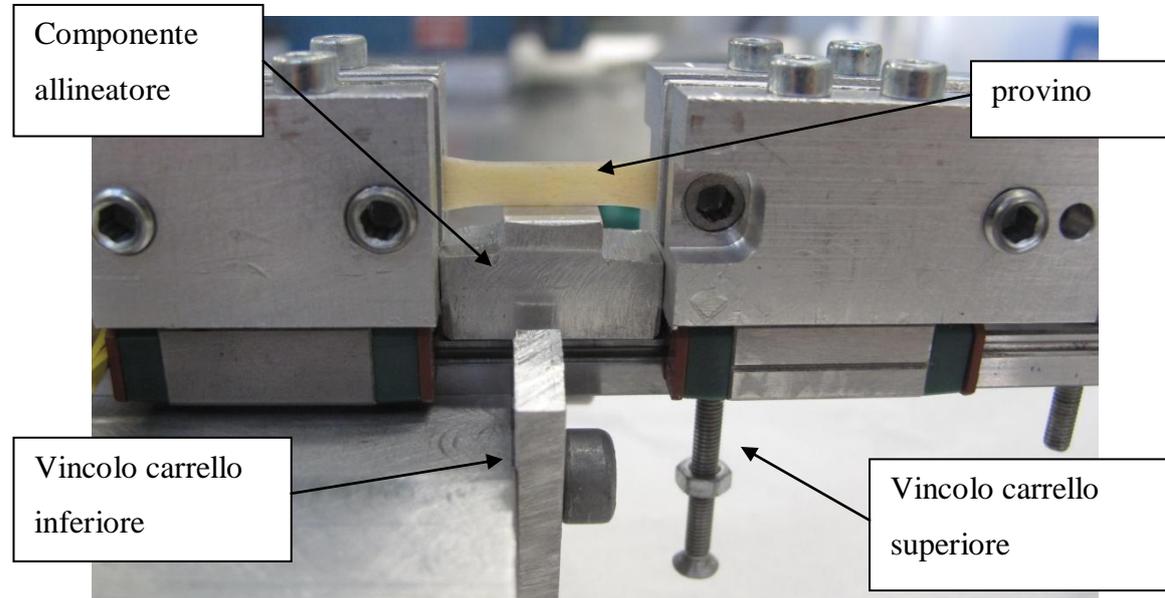


Figura 4.17 – allineamento del provino

4.7 POSIZIONAMENTO IN MACCHINA

In questa fase ho posizionato l'attrezzatura, con il provino bloccato sul carrello superiore, sulla cella di carico della macchina di prova. In particolare sfruttando due battute precedentemente rese solidali alla cella di carico, ho posizionato l'attrezzatura in modo che il provino sia allineato con l'asse dell'attuatore oleodinamico. A questo punto per mezzo di una traversa ho fissato l'attrezzatura alla cella di carico. In questa condizione il provino, bloccato sull'afferraggio superiore con questo in battuta sulla vite, risulta nella posizione nella quale verrà eseguita la prova di trazione. È perciò ora possibile regolare il sistema DIC in particolare l'orientazione dei polarizzatori delle luci e delle telecamere e la messa a fuoco per poter verificare se il pattern è stato eseguito correttamente. A questo punto ho idratato il provino per l'ultima volta bagnando con soluzione salina le tre superfici non verniciate. Non è possibile idratare la superficie verniciata in quanto i riflessi generati dall'acqua non permetterebbero la corretta acquisizione delle immagini da parte del sistema DIC. A questo punto ho applicato al provino i due estensometri facendoli passare dall'estremità libera del provino già accoppiati tra loro per mezzo di due elastici: uno che collega i due bracci superiori e uno che collega i due bracci inferiori (Figura 4.18).

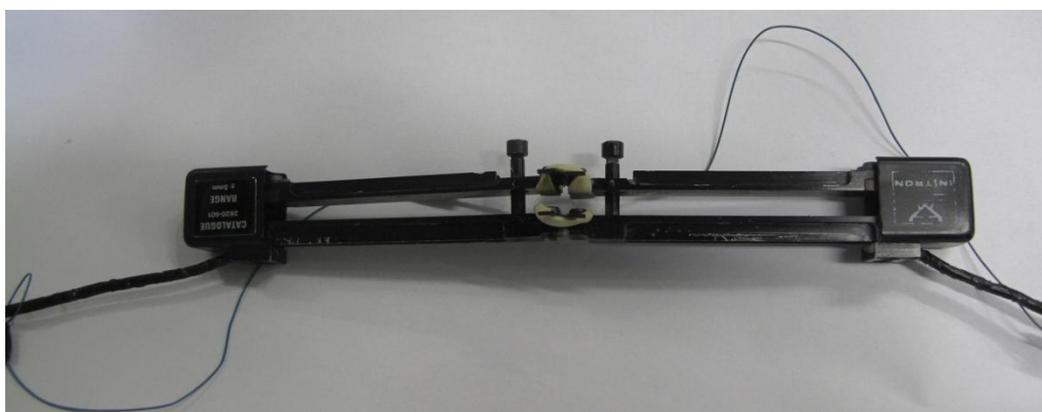


Figura 4.18 – i due estensometri accoppiati per mezzo di due elastici prima del posizionamento sul provino

Il montaggio accoppiato è necessario vista l'impossibilità di fissare in maniera agevole gli elastici circondando il provino quando questo sia già bloccato da entrambi gli afferraggi. Ho posizionato inoltre gli elastici in modo da massimizzare l'area osservabile dalle telecamere del sistema DIC. Posizionati gli estensometri ho afferrato anche l'estremità inferiore del provino. Ora è possibile chiudere la catena di applicazione del

carico perciò ho inserito i due perni che vincolano i due snodi sferici al carrello superiore e all'attuatore. In particolare ho anche ruotato l'attuatore in modo da permettere un montaggio dei due perni a 90° . In questa fase è possibile regolare il tempo di esposizione delle telecamere. Questo non era possibile prima in quanto l'applicazione degli estensometri genera delle ombre in grado di modificare la luminosità della superficie osservata dal sistema DIC. Infine ho rimosso i perni che definiscono la posizione di riferimento dei due bracci degli estensometri. A questo punto il sistema è nella condizione di esecuzione della prova di trazione (Figura 4.19; Figura 4.20).

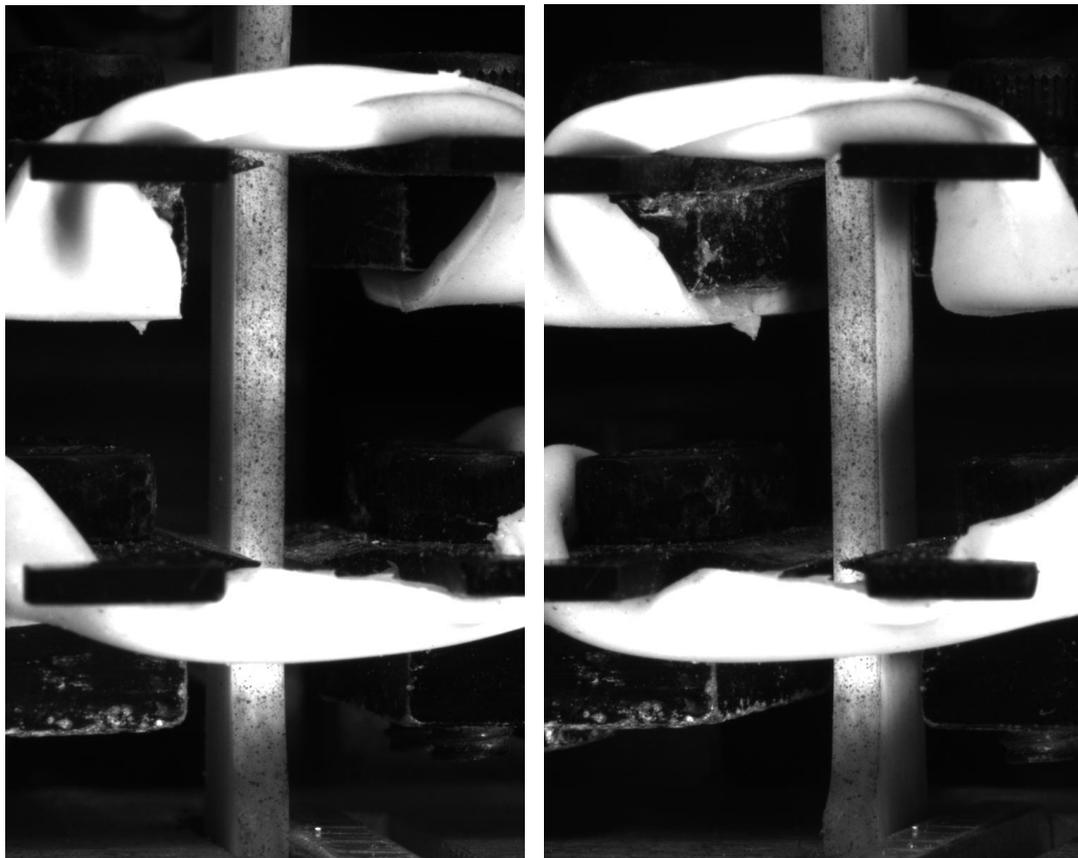


Figura 4.19 – istantanea del provino verniciato con i due estensometri posizionati visto dalle due telecamere

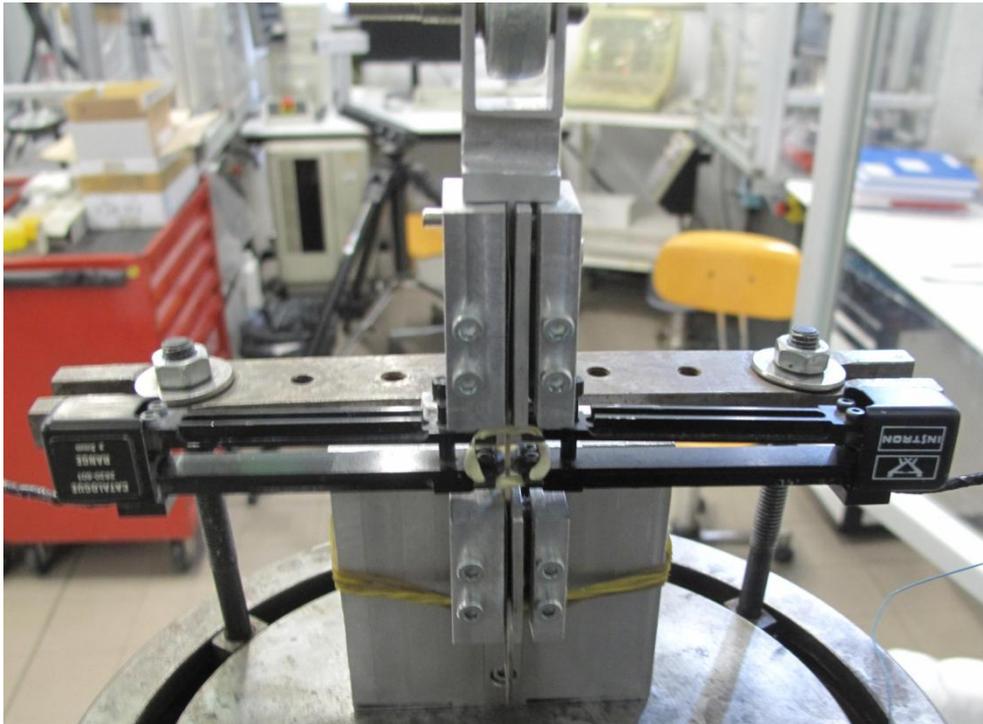


Figura 4.20 – il sistema pronto per l'esecuzione della prova

4.8 ESECUZIONE DELLA PROVA

L'applicazione del carico avviene per mezzo di una macchina di prova oleodinamica (Instron 8502) dotata di una cella di carico con range ± 5 KN e classe di precisione 0.5%. Ho impostato il campionamento a una frequenza pari a 5 KHz. Nella prima fase della prova ho impostato manualmente un precarico di trazione di circa 10 N. L'applicazione del carico di trazione fino a rottura è invece caratterizzato da una corsa dell'attuatore di 2 mm con velocità pari a 2 mm/s. Tali parametri sono dettati dalle seguenti motivazioni:

- essendo la lunghezza libera tra gli afferraggi pari a circa 20 mm tale velocità di applicazione del carico permette di sollecitare il tessuto analogamente ai tassi di deformazione fisiologici a cui è soggetto il tessuto osseo corticale *in vivo* cioè circa 0.1 s^{-1} ;
- ipotizzando che il tessuto collassi quando venga imposto un tasso di deformazione pari a circa l'1%, una corsa di 2 mm garantisce di raggiungere la rottura del provino.

Essendo la prova molto rapida ho impostato la frequenza di campionamento del sistema DIC a 29 Hz in modo da poter disporre del numero massimo di fotogrammi possibile per il calcolo da parte del software di spostamenti e deformazioni. Purtroppo la frequenza di

campionamento massima a 29 Hz determina un limite nell'utilizzo dei dati acquisiti con il sistema ottico come descritto successivamente.

4.9 SCANSIONE MEDIANTE MICROTOMOGRAFIA COMPUTERIZZATA

Al termine della prova ho previsto la scansione del tessuto osseo costituente ciascun provino mediante microtomografia computerizzata (μ CT) per ricavare la densità ossea (BMD) e la porosità del tessuto. Questi parametri infatti sono significativamente correlati alle proprietà meccaniche del tessuto. Essendo la scansione con μ CT caratterizzata da una durata di circa 2 ore, posso eseguirla solo al termine della fase di caratterizzazione meccanica in quanto eseguendola prima si rischierebbe di compromettere la struttura del collagene. Infatti nel corso della scansione il provino si scongela e si disidrata. Lo strumento utilizzato per l'acquisizione è un microtomografo computerizzato (Skyscan) dotato di un tubo a raggi X, di un porta campione rotante per la scansione del provino e di una unità di rilevazione del segnale trasmesso per l'acquisizione delle immagini di proiezione. Il processo di scansione è controllato da un computer. Per permettere l'acquisizione di tutto il tratto calibrato del provino, diviso in due dopo la prova di trazione, ho incollato le due superfici di frattura con cianacrilato in modo da ripristinare la geometria originale del provino. Ora ho posizionato il provino sul porta campione rotante il quale, dotato di un opportuno afferraggio da me realizzato, permette di mantenere il provino in posizione verticale per tutto il tempo necessario all'acquisizione. Tale afferraggio garantisce inoltre che il tratto calibrato sia all'interno del volume acquisito durante tutta la scansione nonostante la rotazione attorno all'asse verticale. I parametri di acquisizione utilizzati per la scansione dei provini sono:

- sorgente raggi X alimentata a 80 KV e 124 μ A;
- filtro di alluminio spessore 1 mm;
- tempo di esposizione 5.9 s;
- passo di rotazione di 0.9° su 180° complessivi;
- campo di vista 6x6 mm.

Con questi parametri di acquisizione si ottiene una risoluzione di 6 μ m/voxel. Disponendo di una finestra di acquisizione di 6x6 mm sono necessarie due scansioni successive per poter acquisire l'intero volume costituente il tratto calibrato di lunghezza

10 mm. La procedura di scansione prevede che il porta campione venga ruotato di 0.9° tra un'acquisizione e la successiva fino a percorrere un angolo di 180° . Al termine della procedura la serie di immagini di proiezione viene utilizzata per la ricostruzione 3D della microstruttura del campione di tessuto osseo dalla quale è possibile ricavare la densità ossea e la porosità del tessuto.

4.10 ANALISI DEI DATI

Nei paragrafi successivi presento le analisi e i calcoli che ho eseguito sui dati rilevati durante la prova per la caratterizzazione meccanica del tessuto osseo corticale. In particolare ho utilizzato il sistema di misura ottico per verificare il corretto svolgimento della prova e l'applicabilità del sistema DIC presente in laboratorio su una superficie ridotta. I dati ottenuti invece dalla cella di carico e dagli estensometri sono stati utilizzati per l'analisi delle caratteristiche meccaniche del tessuto.

4.10.1 MISURE CON CORRELAZIONE DIGITALE DI IMMAGINI

Le due telecamere del sistema DIC inquadrano e fotografano il provino per tutto lo svolgimento della prova. Per tale motivo ho sfruttato il sistema DIC per verificare il corretto svolgimento della prova. In particolare la sola analisi visiva di ciascun fotogramma ha permesso di:

- verificare che durante la prova non si verificano disallineamenti tra l'afferraggio superiore e quello inferiore;
- verificare che i bracci dell'estensometro siano posizionati all'interno del tratto calibrato;
- osservare se al termine della prova la rottura sia avvenuta internamente o esternamente ai bracci dell'estensometro in quanto i bracci non comprendono tutto il tratto utile del provino.

Dalla mappa degli spostamenti e delle deformazioni elaborata dal software ARAMIS invece ho potuto verificare che il provino fosse sollecitato a trazione pura e che non fosse soggetto a componenti flessionali causate da eventuali disallineamenti tra gli afferraggi nella fase di bloccaggio del provino. Essendo la prova molto rapida l'acquisizione

fornisce generalmente meno di 10 fotogrammi nel tratto lineare pertanto i dati acquisiti con il sistema ottico potrebbero non essere sufficienti ad una misura accurata delle caratteristiche meccaniche del tessuto osseo. Tenendo a mente questa limitazione ho comunque usato i dati acquisiti per confrontare i risultati ottenuti con il sistema DIC con quelli ottenuti dagli estensometri. Sfruttando un algoritmo fornito dal produttore ho potuto calcolare il modulo elastico e la tensione di snervamento calcolata come la tensione che induce una deformazione permanente dello 0.2%. Per il calcolo del modulo elastico ho utilizzato tutti i fotogrammi disponibili all'interno dell'andamento lineare della curva tensione-deformazione verificando che al termine dell'elaborazione il coefficiente di determinazione R^2 risultasse maggiore di 0.99 per massimizzare il numero di fotogrammi inclusi nel calcolo a discapito della precisione.

4.10.2 MISURE CON TRASDUTTORE MECCANICO

Il campionamento a 5 KHz della cella di carico e degli estensometri fornisce i valori rilevati durante tutta la prova della forza applicata al provino e dello spostamento relativo tra i due bracci degli estensometri. Per il calcolo della sezione resistente del tratto calibrato ho utilizzato la media delle tre misure di spessore e larghezza. Per prima cosa ho quindi convertito i valori di carico e spostamento in tensione e deformazione ingegneristiche. A questo punto per ogni valore di deformazione ho calcolato il valore medio tra i due estensometri. In questo modo per i calcoli successivi ho una sola curva tensione-deformazione. Ora avendo a disposizione l'intera curva tensione deformazione per punti ho calcolato la tensione massima R_m e la deformazione a rottura ϵ_u . Dalla curva tensione-deformazione ho inoltre ricavato il modulo elastico calcolato come la pendenza del tratto lineare iniziale (Figura 4.23). Per la scelta dei punti costituenti il tratto lineare ho utilizzato i seguenti criteri:

- come limite inferiore ho utilizzato il primo punto caratterizzato da un valore di tensione maggiore a 5 MPa;
- come limite superiore ho utilizzato l'ultimo punto disponibile in grado di fornire una regressione lineare con coefficiente di determinazione R^2 maggiore di 0.999. Per fare questo ho calcolato il coefficiente R^2 per tutti i punti compresi tra il limite inferiore e l'ultimo punto. Ora ho escluso iterativamente punti dalla regressione mantenendo fisso il limite inferiore fino al raggiungimento del valore

soglia di 0.999. Tale procedura fornisce una misura sensibilmente più precisa rispetto al sistema DIC il quale permette di raggiungere un valore di R^2 pari a 0.99.

Ricavando anche l'equazione della retta di regressione e traslandola di un valore di deformazione pari allo 0.2% ho ricavato il limite di proporzionalità cioè il valore di tensione all'intersezione di tale retta con la curva tensione-deformazione. Come per i calcoli effettuati sui dati ottenuti dal sistema DIC tale valore è inteso come la tensione che impone una deformazione permanente dello 0.2% al provino. Il valore di deformazione a cui si raggiunge tale tensione è la deformazione di snervamento ε_y . Con il metodo dei trapezi ho infine calcolato la tenacità L intesa come l'area sottesa dalla curva tensione-deformazione. In particolare ho calcolato tale grandezza sia come tenacità a rottura L_u utilizzando tutti i punti della curva, sia come lavoro a snervamento L_y utilizzando solo i punti fino al carico di snervamento calcolato precedentemente. Essendo la prova caratterizzata da un precarico di circa 10 N la curva tensione deformazione non parte dall'origine ma da un punto caratterizzato da una tensione positiva di circa 2.5 MPa. Per questo motivo nel calcolo delle due tenacità ho aggiunto una piccola area cioè quella del triangolo racchiuso tra gli assi x e y avente come ipotenusa la retta caratteristica del calcolo del modulo elastico ipotizzata passante per il primo punto del campionamento caratterizzato da deformazione nulla e tensione di precarico.

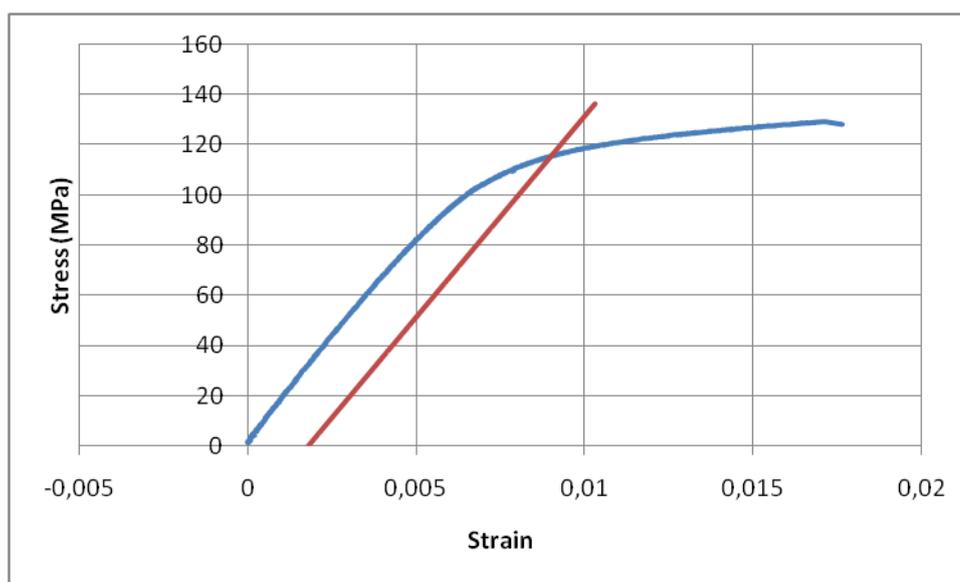


Figura 4.21 – esempio di curva tensione-deformazione con rilevamento del limite di proporzionalità

4.10.3 ANALISI STATISTICA

Le grandezze calcolate sui tre provini estratti da ciascun lato non possono essere considerate misure indipendenti in quanto derivano da provini ottenuti in posizione contigua del medesimo femore. Pertanto sui risultati ottenuti ho eseguito un test statistico di tipo ANOVA (Analysis of Variance) per misure ripetute in cui le variabili indipendenti erano due: il soggetto e il lato. Questa analisi l'ho usata per valutare l'eventuale effetto delle due variabili sulle grandezze meccaniche e fisiche misurate. Poichè queste grandezze non possono essere considerate indipendenti a priori, ho anche eseguito un'analisi di correlazione per verificare se sussista una correlazione accoppiando progressivamente le singole grandezze meccaniche e fisiche rilevate.

CAPITOLO 5

RISULTATI

5.1 ACQUISIZIONE CON IL SISTEMA DIC

Tutti i provini sono stati provati senza problemi operativi. In generale non si sono riscontrati problemi nell'acquisizione delle immagini della superficie del provino. A titolo di esempio è riportata la mappa degli spostamenti calcolata nel tratto utile compreso tra i due estensometri (Figura 5.2). La figura mostra come la superficie sia correttamente identificata, essendo praticamente completa la mappa degli spostamenti. Il sistema DIC ha confermato la corretta condizione di carico a trazione pura dei provini. In particolare dalla mappa degli spostamenti elaborata dal software si nota come il provino subisca spostamenti uniformi fino a rottura lungo le sezioni trasversali (Figura 5.2).

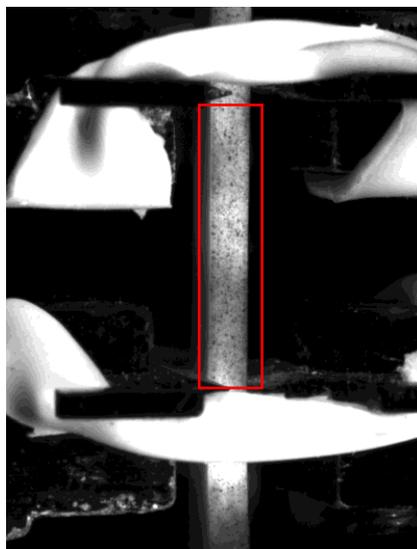


Figura 5.1 – inquadratura della telecamere con evidenziata la superficie del provino acquisita per il calcolo di spostamenti e deformazioni

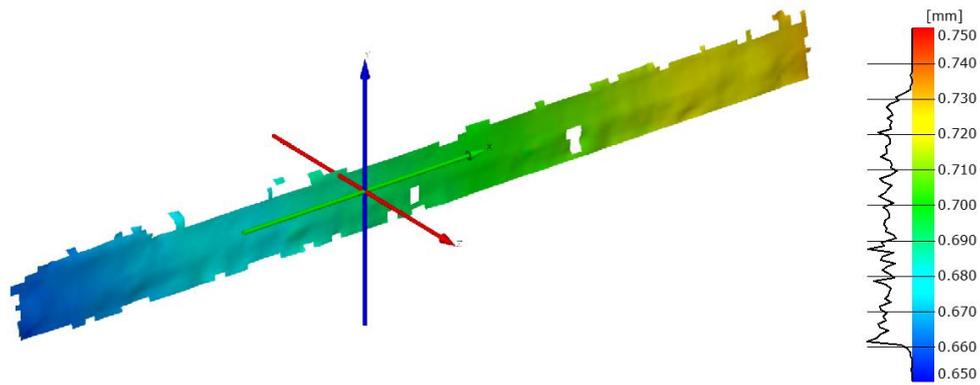


Figura 5.2 – esempio di mappa degli spostamenti rilevata dal sistema DIC nell'ultimo frame perciò al massimo 0.034 s prima della rottura

Il software elabora anche la mappa delle deformazioni relativa agli spostamenti acquisiti. Essendo però la deformazione ottenuta per derivazione degli spostamenti, tale misura risulta fortemente influenzata dal rumore intrinseco dell'acquisizione degli spostamenti (Figura 5.3).

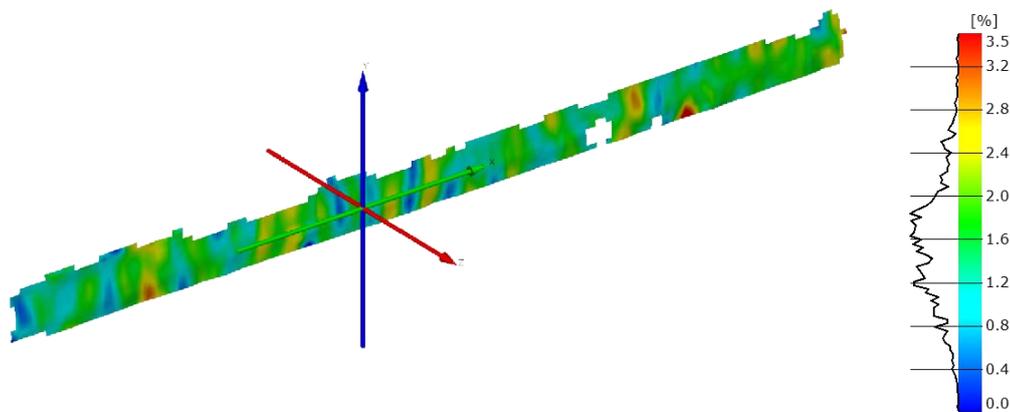


Figura 5.3 – esempio di mappa delle deformazioni elaborata dal sistema DIC nell'ultimo frame perciò al massimo 0.034 s prima della rottura

5.2 ACQUISIZIONE CON IL SISTEMA MECCANICO E CONFRONTO CON IL SISTEMA DIC

L'analisi delle curve tensione-deformazione ha evidenziato come nella maggior parte dei casi le curve fornite dai due estensometri si sovrappongono (Figura 5.4). Prendendo come riferimento l'ultimo punto utilizzato per il calcolo del modulo elastico, la differenza tra le letture degli spostamenti dei due estensometri presentano un valore medio di $2.94 \mu\text{m}$ con deviazione standard pari a $2.54 \mu\text{m}$. In un solo caso tale differenza è risultata importante pari a circa $10 \mu\text{m}$ (Figura 5.6). L'analisi della mappa degli spostamenti elaborata dal sistema DIC per tale provino ha dimostrato come il provino fosse sollecitato a trazione. Pertanto non era atteso uno spostamento differenziale tra i due estensometri. Analizzando i singoli fotogrammi è stato però possibile imputare tale variazione a piccoli, ma visibili, scivolamenti nella zona di contatto tra il provino e i bracci degli estensometri. Tali scivolamenti sono stati imputati a un errore nel montaggio degli estensometri. Infatti i coltelli dei bracci mobili non erano allo stesso livello ma a livelli diversi. Pertanto durante la prova l'azione dell'elastico ha determinato lo scivolamento dei due coltelli in direzioni opposte. Per tale motivo questo provino è stato escluso dai calcoli delle proprietà meccaniche del tessuto osseo corticale (Cfr. 5.3).

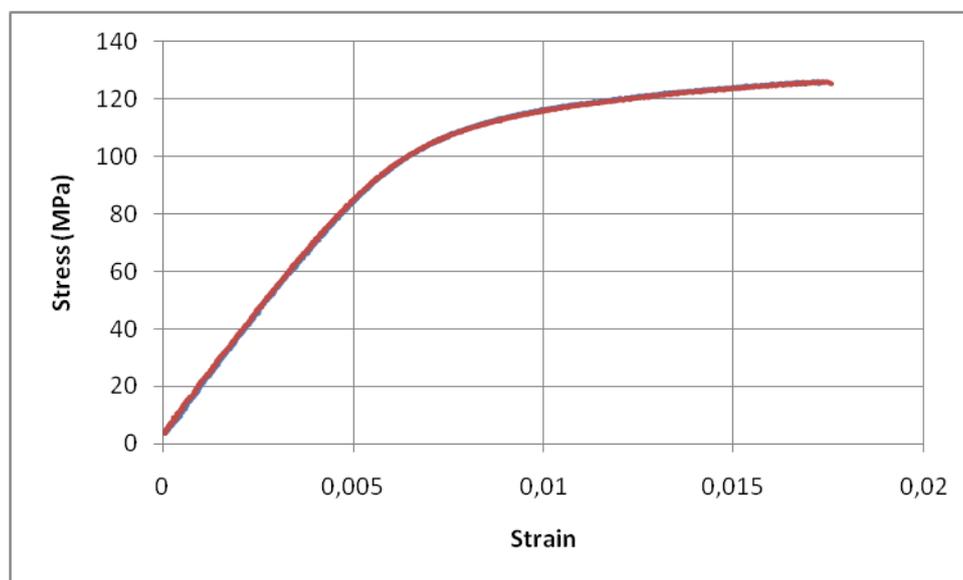


Figura 5.4 – esempio di curve tensione deformazione misurate dai due estensometri. Le curve non sono identificabili in quanto sovrapposte

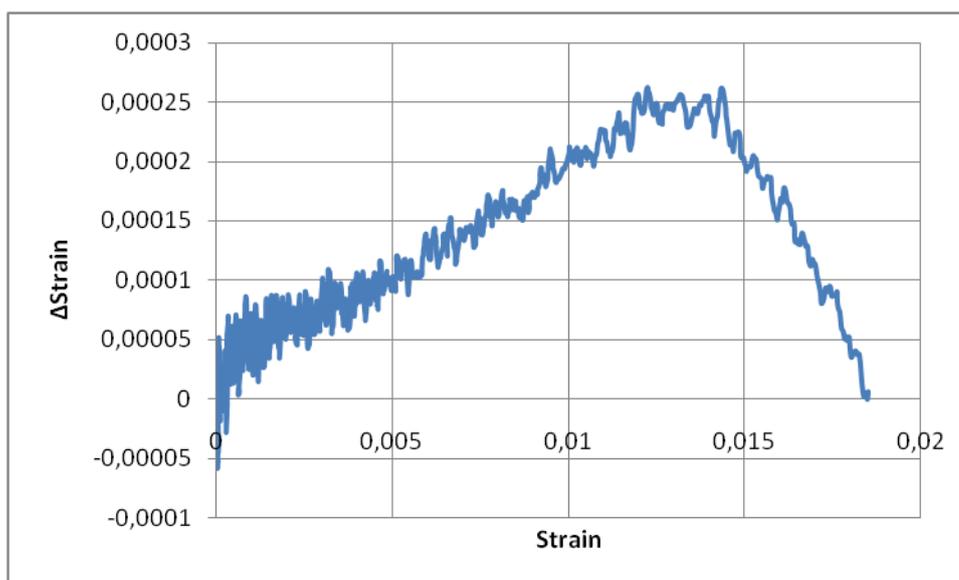


Figura 5.5 – differenza nelle deformazioni ottenute dai due estensometri all’aumentare della deformazione media a cui è stato applicato un filtro a media mobile su 15 valori

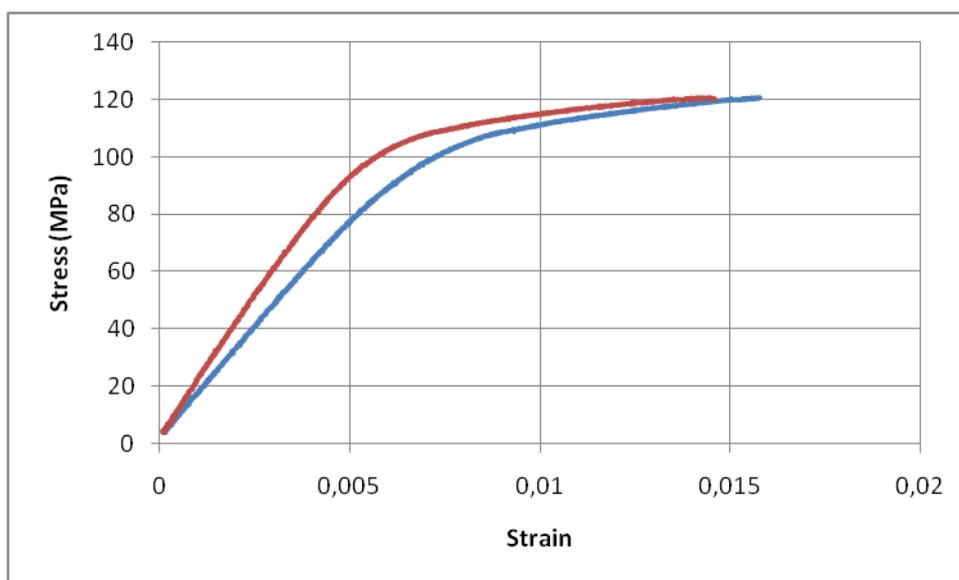


Figura 5.6 – curve tensione-deformazione nel caso del provino escluso

A parte questo caso isolato la sovrapposizione delle curve tensione-deformazione ottenute dai due estensometri conferma quanto osservato con il sistema DIC ovvero che il provino, sia nella fase di montaggio che nella fase di carico, non è soggetto a componenti flessionali indesiderate dovute ad eventuali disallineamenti. Un’eventuale flessione del provino infatti farebbe divergere le due curve nel tratto lineare. Il confronto con i dati calcolati sulla base degli spostamenti misurati sui fotogrammi acquisiti con il DIC conferma l’applicabilità del sistema ottico per la misura degli spostamenti al provino in

esame nonostante le piccole dimensioni della superficie acquisita. Infatti tali punti si posizionano coerentemente con la curva tensione deformazione ricavata per mezzo degli estensometri (Figura 5.7).

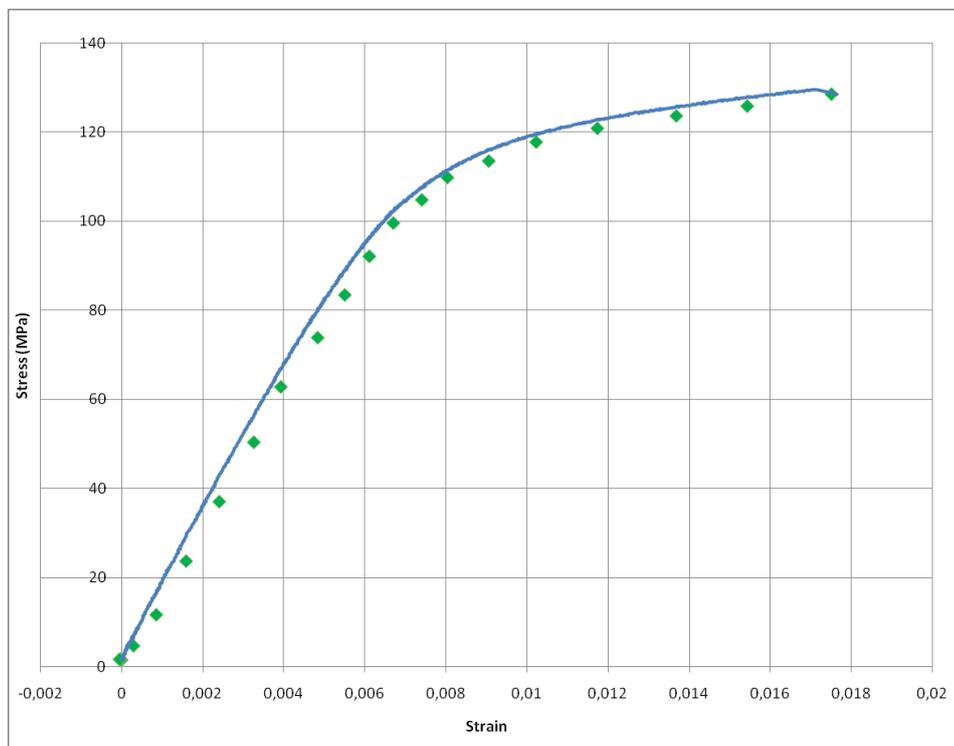


Figura 5.7 – esempio punti ottenuti dal sistema DIC sovrapposti alla curva tensione-deformazione ottenuta dagli estensometri

Il problema è rappresentato dalla velocità di acquisizione attualmente limitato a 29 Hz. Il numero limitato di punti forniti dal sistema DIC non permette il calcolo accurato delle proprietà meccaniche del tessuto nel tratto iniziale lineare della curva tensione-deformazione. Infatti per il calcolo del modulo elastico sono disponibili circa 8 punti contro gli oltre 1000 forniti dagli estensometri che acquisiscono a 5 KHz (Figura 5.8). Il limitato numero di punti implica che includere o meno i punti estremi nel calcolo del modulo elastico determini differenze fino a circa ± 1 GPa. Questo si ripercuote anche nel calcolo della tensione e deformazione di scostamento dalla proporzionalità. Inoltre, dato che la curva è fortemente discontinua, per ottenere la tensione e la deformazione di scostamento dalla proporzionalità, la linearizzazione necessaria tra i punti consecutivi comporta un errore non trascurabile essendo i punti molto distanti tra loro

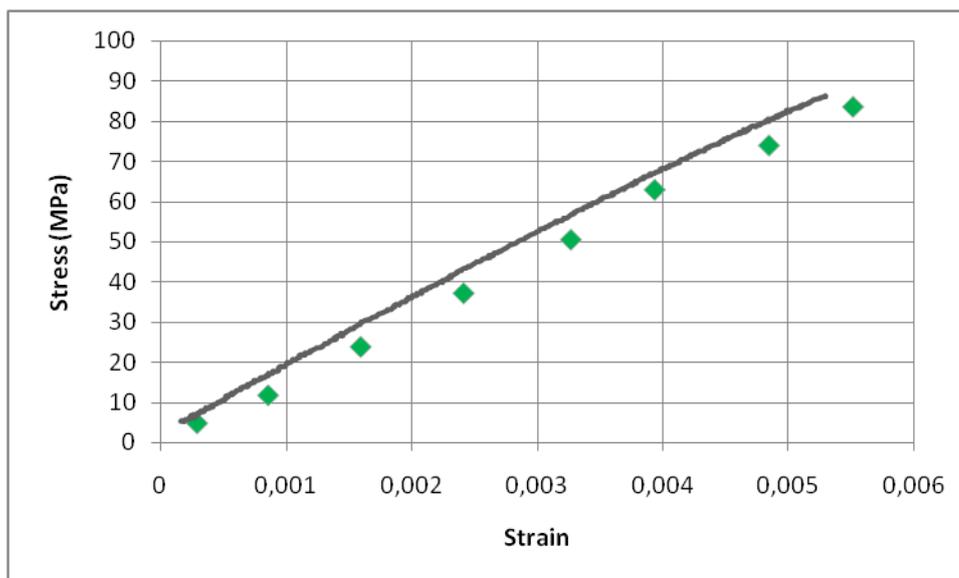


Figura 5.8 – confronto tra i punti forniti dal sistema DIC e dagli estensometri

Confrontando i valori del modulo elastico ottenuti dai due sistemi di misura, su tutti i provini, si osservano delle differenze. La differenza tra il valore rilevato dal sistema DIC rispetto a quello calcolato per mezzo degli estensometri, assunto come riferimento, presenta in percentuale un valore medio pari a -10.9% con deviazione standard 8.4%.

5.3 CARATTERIZZAZIONE DEL TESSUTO OSSEO CORTICALE

L'analisi dei risultati ha evidenziato il comportamento anomalo dei provini estratti in posizione laterale da un femore. Infatti tutti i provini presentavano un comportamento fragile ovvero con l'assenza del tratto plastico della curva tensione-deformazione. In questi casi non è possibile il calcolo delle proprietà meccaniche di scostamento dalla proporzionalità. Tale comportamento è completamente differente dagli altri campioni di tessuto. Non disponendo di tali grandezze ho dovuto escludere dall'analisi statistica i risultati ottenuti dai provini estratti da tale femore in quanto l'analisi statistica richiede i dati completi per entrambe le zone (mediale e laterale) per tutti i donatori oltre al fatto che tali anomalie sono imputabili alla struttura del femore. Inoltre è stato escluso il provino in cui è stato osservato lo slittamento dei coltelli. Pertanto il dataset è composto dai dati ottenuti da 23 campioni di tessuto. L'analisi statistica ha evidenziato come siano presenti differenze significative tra i soggetti riguardo alle principali proprietà meccaniche e

fisiche del tessuto osseo corticale. In particolare sono state osservate differenze significative per le seguenti grandezze:

- densità ossea ($p=0.02$);
- modulo elastico ($p=0.01$);
- tensione di scostamento dalla proporzionalità ($p=0.001$);
- tensione di rottura ($p<0.001$).

Al contrario il tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità sembra essere un invariante ($p=0.15$). Riguardo alle differenze tra le proprietà meccaniche e fisiche in funzione del lato di estrazione dei provini, solo la tensione di rottura presenta differenze significative ($p=0.004$) seppur piccole. Infatti i provini estratti in posizione mediale presentano valori della tensione di rottura maggiori di mediamente 4 MPa rispetto ai provini estratti in posizione laterale, pari a circa il 3% della misura. L'analisi di correlazione ha evidenziato invece correlazioni particolarmente significative tra la BMD e il tasso di deformazione a rottura ($p=0.01$, $R^2=0.3$), tra la tensione di rottura e la tensione di scostamento dalla proporzionalità ($p<0.001$, $R^2=0.6$) e tra la tensione di scostamento dalla proporzionalità e il modulo elastico ($p<0.001$, $R^2=0.5$). Di seguito riporto i grafici relativi a tali correlazioni (Figura 5.9, Figura 5.10, Figura 5.11).

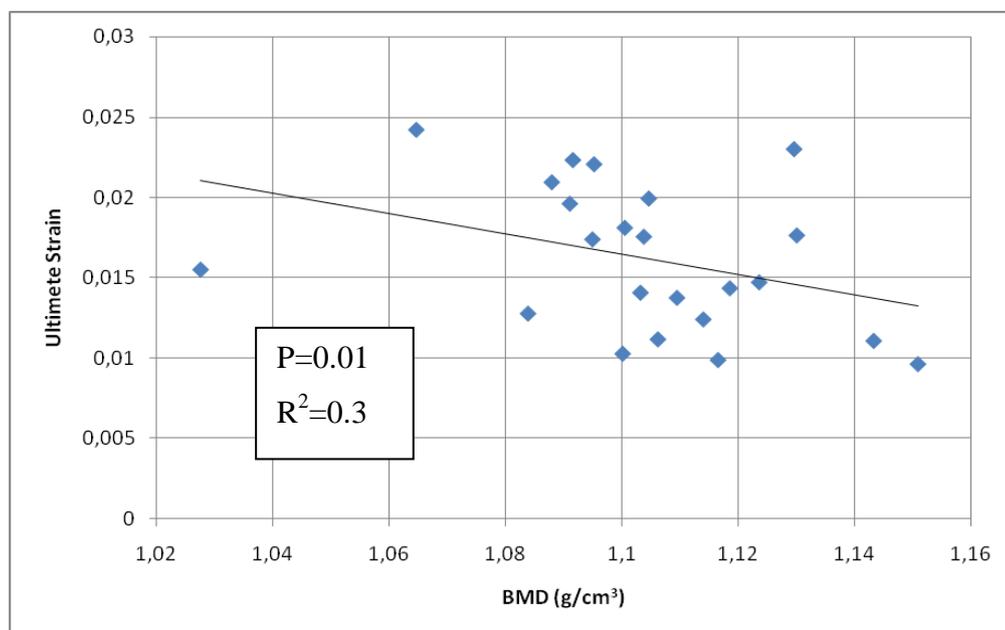


Figura 5.9 - correlazione tra la densità ossea e la deformazione a rottura

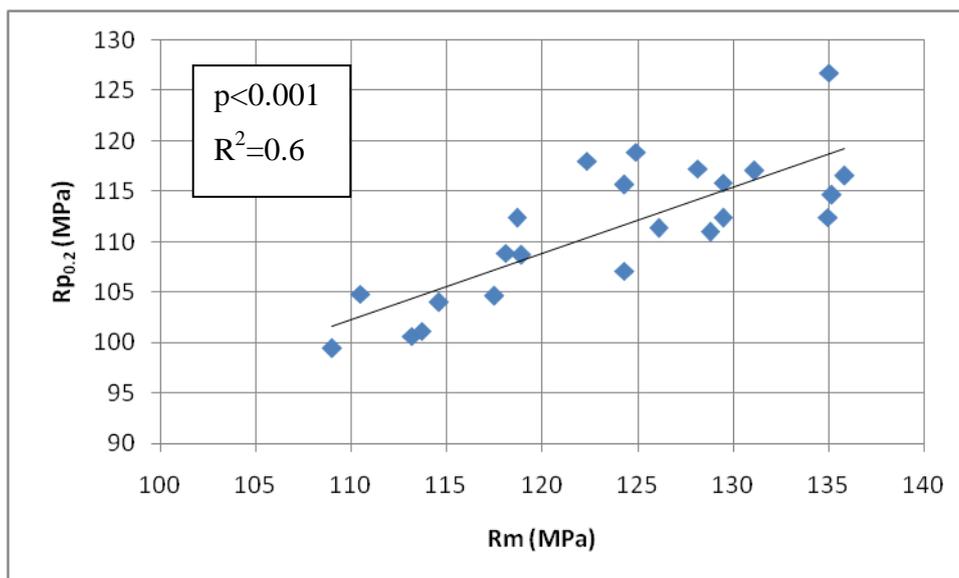


Figura 5.10 – correlazione tra la tensione di rottura e la tensione di scostamento dalla proporzionalità

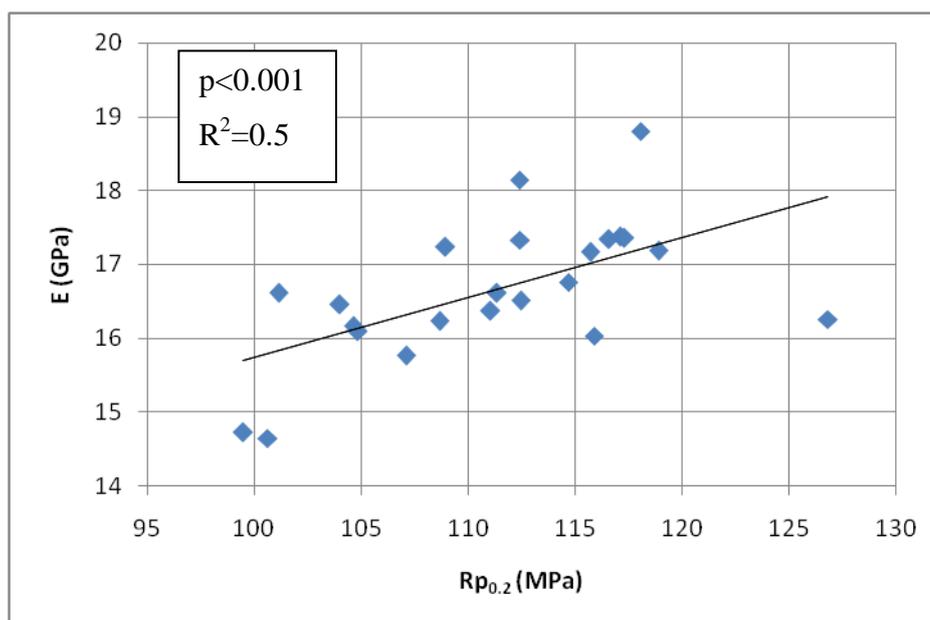


Figura 5.11 – correlazione tra la tensione di scostamento dalla proporzionalità e il modulo elastico

Altre correlazioni significative sono state rilevate tra la deformazione e la tensione di scostamento dalla proporzionalità ($p=0.03$), tra la tensione di rottura e il modulo elastico ($p=0.02$) e tra la tensione di rottura e il tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità ($p=0.04$). Analizzando però la distribuzione dei dati si osserva che le correlazioni sono deboli come evidenziato dai valori del coefficiente di determinazione R^2 molto bassi (< 0.2).

CAPITOLO 6

DISCUSSIONI

6.1 IL MODELLO SPERIMENTALE

L'esecuzione delle prove sperimentali ha dimostrato l'efficacia del nuovo protocollo destinato alla caratterizzazione meccanica a trazione del tessuto osseo corticale estratto dalla parte prossimale del femore. Questo risultato è di notevole importanza per le attività del laboratorio in quanto non era ancora presente un protocollo validato per l'estrazione e la caratterizzazione meccanica a trazione di provini di piccole dimensioni estratti in posizione controllata senza sacrificare porzioni importanti del tessuto corticale. Infatti il protocollo permette di estrarre fino a quattro provini per ogni lato del femore. Inoltre la procedura sperimentale è accurata in quanto permette di estrarre correttamente i provini nonostante le dimensioni della sezione estremamente ridotte con una precisione di 0.01 mm sia per lo spessore che per la larghezza. Tale precisione è confrontabile con quella ritrovata in altri studi per quanto riguarda lo spessore (Abdel-Wahab, 2011). Riguardo alla larghezza invece l'utilizzo di una fresatrice a controllo numerico dotata di una fresa diamantata permette di ottenere una precisione sensibilmente migliore in quanto in altri studi in cui la precisione è un ordine di grandezza peggiore ovvero pari al decimo di millimetro circa (Abdel-Wahab, 2011). Nonostante non siano presenti ulteriori studi in cui viene dichiarato l'errore nella misura delle dimensioni del provino, un livello di accuratezza così elevato è fondamentale per una valutazione precisa delle proprietà meccaniche quando il provino presenti dimensioni molto ridotte. Infatti nonostante uno spessore pari a 1 mm il protocollo permette precisioni di due ordini di grandezza inferiori rispetto alle dimensioni del provino. L'estrazione di provini di dimensione controllata costituisce solo una parte del problema, riguardo alla precisione necessaria al corretto svolgimento della prova. Anche l'esecuzione della prova di trazione deve essere accurata. Infatti si può calcolare che un disallineamento tra gli afferraggi di 0.1 mm determina una flessione del tessuto che compone il provino con tensioni fino al 10% di quelle raggiunte al carico massimo. La validità del protocollo è evidenziata dalla sovrapposizione delle

curve tensione-deformazione ottenute dai due estensometri in quanto è verificato il corretto stato di sollecitazione a trazione semplice del provino durante l'applicazione del carico. I risultati ottenuti, omogenei per l'intera campagna di prove, inoltre evidenziano come i provini vengano estratti correttamente senza eventuali danneggiamenti derivanti dal taglio del tessuto osseo corticale. La sovrapposizione dei punti ottenuti col sistema DIC alle curve tensione-deformazione ottenute con trasduttore meccanico dimostra anche l'applicabilità di tale sistema di misura al tessuto osseo corticale anche con ridotte dimensioni della superficie da acquisire. La corretta acquisizione della superficie però è possibile solo applicando alla superficie un pattern con speckle ad elevato contrasto di dimensioni adeguate alla finestra di misura delle telecamere. Seppur utilizzando il sistema DIC su materiali compositi, tale raccomandazione è stata evidenziata anche in un altro studio in cui la misura è ottimizzata per speckle in grado di occupare circa 6 pixel (Robert, 2007). L'acquisizione della superficie con il sistema DIC ha inoltre permesso a posteriori di analizzare visivamente ogni fotogramma relativo allo svolgimento della prove. In questo modo è stato possibile notare lo scivolamento dei bracci degli estensometri nell'unico caso in cui le due curve tensione-deformazione ottenute non si sovrapponevano. Purtroppo la frequenza limitata disponibile per le telecamere presenti in laboratorio non ha permesso di sfruttare il sistema DIC per il calcolo preciso delle caratteristiche meccaniche del tessuto osseo corticale. Infatti, essendo la prova molto rapida per poter replicare le condizioni di carico a cui il tessuto osseo è fisiologicamente sottoposto in vivo, per il tratto lineare della curva tensione-deformazione si disponeva solo di circa otto punti. Con un numero così limitato di punti l'errore di misura delle caratteristiche meccaniche risulta comparabile con le differenze imputabili al tessuto osseo corticale. A tal proposito può essere interessante valutare la possibilità di aumentare la frequenza di acquisizione delle telecamere in quanto altri studi effettuati sul tessuto molle hanno evidenziato come per il modulo elastico si possano raggiungere errori piuttosto ridotti dell'ordine del 2% in condizioni di carico applicato lentamente (Zhang, 2005). Va sottolineato comunque come il tessuto molle sia soggetto a grandi deformazioni che permettono di trascurare più facilmente il rumore. I pochi punti disponibili impongono un limite nell'accuratezza del modulo elastico con regressione lineare a un coefficiente di determinazione pari a 0.99. Questo limite sottostima necessariamente il modulo elastico includendo nella regressione punti non in campo lineare. Purtroppo non è possibile aumentare tale valore di soglia infatti nel caso in cui si tentasse di raggiungere un coefficiente di determinazione pari a 0.999, come fatto per gli

estensometri, il software effettuerebbe il calcolo del modulo elastico utilizzando solo due punti. Da notare come una riduzione da 0.999 a 0.998 nella curva ottenuta con gli estensometri determina una riduzione del modulo elastico fino all'1.5% circa. Tale limite causa inoltre una eventuale sovrastima della tensione e del tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità dato che sottostimando il modulo elastico il punto caratterizzato da una deformazione permanente pari allo 0.2% risulta spostato verso la rottura. La misura precisa delle deformazioni puntuali utilizzando il sistema DIC, con errori inferiori al 5% della misura, inoltre non è possibile a causa del rumore dovuto alla derivazione della mappa degli spostamenti. Tale rumore, come analizzato anche in altri studi (Schreier, 2000; Lionello, 2012), comporta una distribuzione a macchie delle deformazioni sulla superficie acquisita. Considerando il picco di deformazione associato alle macchie infatti nel mio studio si verificano errori fino al 50% della misura ottenuta dagli estensometri. Una misura coerente del tasso di deformazione può essere perciò effettuata applicando alla mappa delle deformazioni un estensometro virtuale. Questo approccio riduce il rumore calcolando la deformazione, in maniera più precisa, sulla base di una variazione di lunghezza. Un'altra soluzione può essere quella di applicare dei filtri alla mappa delle deformazioni (Robert, 2007). In questo modo si ottiene una mappa delle deformazioni a tutto campo con una riduzione del rumore a discapito di una diminuzione nella risoluzione del campo di deformazioni. Tale scelta è particolarmente critica nel mio studio in quanto acquisendo spessori di 1 mm, discretizzata da un limitato numero di pixel e quindi di facet, la diminuzione della risoluzione non permetterebbe di analizzare eventuali anomalie distribuite nello spessore. In questo studio comunque non si era interessati a misurare la mappa delle deformazioni sulla superficie del provino quindi non si è studiata l'applicazione di filtri per eliminare il rumore osservabile nella mappa delle deformazioni.

L'esecuzione delle prove, con l'applicazione di entrambi i sistemi di misura delle deformazioni, ha evidenziato la necessità di un'estrema precisione nel posizionamento degli estensometri e degli elastici in modo da evitare errori nella misura delle deformazioni con trasduttore meccanico dovuti a scivolamenti relativi tra i bracci degli estensometri e il provino. Per risolvere tale inconveniente può essere utile osservare il posizionamento degli estensometri per mezzo delle telecamere del sistema DIC. Infatti queste sono dotate di una elevatissima risoluzione perciò è possibile notare eventuali disallineamenti prima dell'esecuzione della prova in modo da correggerli. Questo

permette di eseguire misure accurate nella caratterizzazione meccanica del tessuto osseo ottenendo un'ottima corrispondenza tra le misure ottenute dai due estensometri.

Per quanto riguarda la caratterizzazione del tessuto sono state eseguite 30 prove su altrettanti provini. Di questi solo uno è stato escluso per di problemi di misura a causa del problema descritto sopra. Va evidenziato che tutti i campioni estratti da un donatore in posizione laterale hanno mostrato un comportamento anomalo, nello specifico il tessuto ha mostrato un comportamento fragile. Sono in corso ricerche per ricostruire il quadro clinico di questo donatore. Infatti, sebbene il donatore sia deceduto causa infarto, si ipotizza che un trattamento farmacologico abbia alterato il meccanismo del rimodellamento osseo alterando di fatto le proprietà del tessuto. Purtroppo al momento della stesura del presenta lavoro non è stato possibile confermare tale ipotesi. L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata assumendo l'ipotesi di distribuzione normale delle variabili e omoschedaticità delle distribuzioni nonostante la limitata dimensione campionaria. Assumendo tali ipotesi l'analisi statistica ha evidenziato come generalmente le proprietà meccaniche e fisiche dipendano dal soggetto ad eccezione del tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità che risulta invariante. Tale risultato è fondamentale in quanto conferma quanto analizzato da altri studi riguardo all'invarianza del tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità (Bayraktar, 2004). Risulta interessante notare anche come il tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità risulti invariante al variare della densità ossea. Questo risultato, in analogia con quanto ottenuto da altri studi, è molto significativo in quanto è dimostrato come la densità ossea influenzi significativamente le altre principali caratteristiche meccaniche (Kaneko, 2002). Inoltre nonostante il tessuto osseo corticale abbia un comportamento differente se sollecitato a trazione o a compressione, l'invarianza del tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità viene evidenziata anche da studi in cui il tessuto osseo corticale veniva sollecitato a compressione (Ohman, 2011). Da un'analisi del comportamento del tessuto osseo corticale risulta inoltre come lo scostamento dalla proporzionalità avvenga per tassi di deformazione di circa il 10% inferiori nel caso in cui il tessuto sia sollecitato a trazione. L'analisi delle differenze tra i provini estratti in posizione mediale e laterale ha evidenziato differenze significative solo per la tensione di rottura con valori di circa 4 MPa maggiori per i provini estratti in posizione mediale, pari a circa il 3%. Poiché non è stata trovata una differenza nei valori di BMD, su questo punto potrebbe contribuire l'informazione ottenuta analizzando la distribuzione del collagene. Infatti la distribuzione del collagene potrebbe essere

influenzata dal fatto che il tessuto osseo sia sollecitato in maniera differente in vivo sul lato mediale rispetto al lato laterale. L'analisi di correlazione ha confermato l'esistenza di una correlazione tra il modulo elastico e la tensione di scostamento dalla proporzionalità. Questo conferma l'ipotesi di invarianza del tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità infatti un aumento della tensione di scostamento dalla proporzionalità è coerentemente correlato con un aumento del modulo elastico come impone la legge di Hooke applicabile al tratto iniziale lineare della curva tensione-deformazione. Tale risultato inoltre risulta ulteriormente in analogia con quanto verificato in altri studi (Fyhrie, 2000) eseguiti su tessuto osseo corticale bovino. Altre correlazioni significative sono risultate tra la tensione di scostamento dalla proporzionalità e la tensione di rottura e tra la densità ossea e il tasso di deformazione a rottura. Quest'ultima seppur in accordo con studi precedenti (Ohman, 2011), è soggetta a errori non trascurabili nel rilevamento del tasso di deformazione a rottura. Infatti tale parametro è fortemente variabile a seconda che la rottura sia avvenuta all'interno o all'esterno dei bracci degli estensometri posizionati sul provino durante la prova. In particolare nei casi in cui la rottura sia avvenuta esternamente ai bracci degli estensometri, questi non sono in grado di misurare correttamente la deformazione associata alla strizione del provino contrariamente ai casi in cui la rottura sia avvenuta internamente ai bracci. L'analisi delle curve tensione deformazione ha inoltre evidenziato come per ogni provino sia presente un tratto plastico prima della rottura successivamente al tratto lineare. Questo tratto, come già detto, è assente nei provini estratti in posizione laterale dal femore del donatore escluso. La presenza del tratto plastico suggerisce che il tessuto osseo corticale in condizioni fisiologiche ha una tenacità che sembra scomparire con l'aumento della velocità di deformazione. Infatti è dimostrato come il tessuto osseo corticale sia soggetto a fratture in maniera fragile quando caricato impulsivamente (McElhaney, 1966). Il comportamento plastico del tessuto osseo corticale in condizioni di carico fisiologiche è fondamentale. Infatti in altri studi è evidenziato come, al raggiungimento dello snervamento del tessuto osseo, si verificano delle microfratture nella struttura che fungono da stimolo per il rimodellamento del tessuto osseo in tali zone (Lee, 2002). Il comportamento plastico del tessuto osseo corticale in condizioni di carico fisiologiche garantisce la possibilità di attivare la fase di rimodellamento prevenendo eventuali fratture ossee. Infatti, nonostante venga raggiunto lo snervamento, il comportamento tenace previene la frattura dell'osso al contrario di quanto avverrebbe in caso di comportamento fragile dove non sarebbe possibile prevenire la rottura

6.2 SVILUPPI FUTURI

Il lavoro presentato si inserisce in un progetto più ampio in cui l'Istituto Ortopedico Rizzoli collabora con altri centri di ricerca con l'obiettivo di valutare l'effetto del collagene sulle proprietà meccaniche del tessuto osseo corticale con lo scopo di studiare se l'organizzazione del collagene è influenzata dal tipo di sollecitazione a cui è soggetto in vivo. A tal proposito quando le valutazioni esterne all'Istituto Ortopedico Rizzoli forniranno i valori relativi alla qualità e organizzazione del collagene sarà necessario eseguire un'analisi statistica per valutare se tale parametro si significativamente dipendente dal lato di estrazione del provino e se sia correlato alle proprietà meccaniche. I risultati ottenuti costituiscono la base sperimentale per ampliare la numerosità campionaria. Dall'analisi delle micro tomografie computerizzate eseguite sui provini sarà poi interessante ricavare il valore della porosità associata ad ogni provino per poter correlare anche questa grandezza alle proprietà meccaniche. Purtroppo non è stato possibile eseguire tale analisi nel mio studio a causa dell'elevato tempo di elaborazione necessario per ricavare la porosità di ogni provino. Può essere anche molto interessante espandere tale studio a provini estratti in posizione anteriore e posteriore dallo stesso sito anatomico in modo da aumentare la numerosità campionaria e verificare con maggior accuratezza l'invarianza del tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità. A tal proposito si può ipotizzare anche di aumentare il numero dei donatori in modo da incrementare ulteriormente la dimensione campionaria estraendo provini da ciascuna delle posizioni anatomiche. Inoltre tramite un'analisi del tessuto è ipotizzabile investigare le cause che hanno portato al comportamento fragile, anomalo, dei provini provenienti dalla posizione laterale di un femore. A tal proposito è possibile analizzare sia la presenza di eventuali microcricche, sia la componente organica, deputata all'incremento di tenacità del tessuto osseo corticale. Infine dalla ricostruzione 3D dei provini ottenuta dalle micro tomografie computerizzate può essere interessante implementare un modello FEM allo scopo di simulare le prestazioni del tessuto osseo corticale avendo a disposizione i valori caratteristici delle proprietà meccaniche di ogni provino misurati sperimentalmente.

CONCLUSIONI

In questo elaborato sono state descritte le attività da me svolte presso il Laboratorio di Tecnologia Medica interno all'Istituto Ortopedico Rizzoli allo scopo di preparare la tesi magistrale in ingegneria meccanica. Nel laboratorio è infatti in corso un'attività di ricerca mirata a correlare le caratteristiche fisiche e meccaniche del tessuto osseo corticale umano con la qualità e la distribuzione del collagene. In particolare l'obiettivo è di verificare se tali proprietà siano influenzate dal tipo di sollecitazioni a cui principalmente il tessuto osseo si trova sollecitato fisiologicamente in vivo. All'interno di tale progetto si è inserito il mio studio allo scopo di progettare e implementare un protocollo atto alla caratterizzazione meccanica del tessuto osseo corticale. È dimostrato come la parte prossimale del femore risulti sollecitata in vivo a compressione nel lato mediale e a trazione in posizione laterale. Tale distretto anatomico è stato perciò caratterizzato meccanicamente. Per eseguire lo studio è stata utilizzata una prova di trazione semplice in modo da ricavare il contributo del collagene su provini estratti longitudinalmente all'asse del femore. Dopo aver definito la geometria e la procedura sperimentale necessaria all'estrazione dei provini è stata perciò realizzato il sistema di applicazione del carico in modo che risultasse coerente con l'applicazione sul provino dei sistemi di misura delle deformazioni. Per la misura delle deformazioni sono stati utilizzati due sistemi di misura: un trasduttore meccanico e un sistema ottico basato sulla correlazione digitale di immagine. La superficie del provino infatti è stata adeguatamente preparata realizzando un pattern stocastico ad elevato contrasto per permettere al sistema ottico basato sulla correlazione digitale di immagine di acquisire la superficie del provino inquadrata dalle telecamere. In tal modo è stata elaborata per ogni provino una mappa degli spostamenti e delle deformazioni imposte al provino durante lo svolgimento della prova. Dai risultati ottenuti innanzitutto è stato verificato il corretto svolgimento della prova. L'analisi statistica ha invece evidenziato come le proprietà meccaniche e fisiche del tessuto osseo corticale umano siano dipendenti dal soggetto ad eccezione del tasso di deformazione di scostamento dalla proporzionalità. Infatti tale grandezza caratteristica di una deformazione permanente applicata al provino pari allo 0.2% è risultata invariante. Inoltre il tessuto osseo corticale non è risultato soggetto a differenze significative delle proprietà

meccaniche, ad eccezione di una differenza significativa, seppur piccola, nella tensione di rottura nonostante il campione venisse estratto da differenti posizioni anatomiche in cui era sollecitato in maniera differente in vivo. Tale aspetto potrebbe trovare un riscontro nelle ulteriori indagini che verranno condotte nel progetto tuttora in corso.

BIBLIOGRAFIA

Abdel-Wahab A.A., Alam K., Silberschmidt V.V., 2010. Analysis of anisotropic viscoelastoplastic properties of cortical bone tissues. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 4 (2011) 807-820

Ajovalasit, A., 2009. "Analisi sperimentale delle tensioni con la fotomeccanica."

Ashman, R.B., 1982. Ultrasonic determination of the elastic properties of cortical bone: techniques and limitations. Ph.D. thesis, Tulane university, New Orleans, LA.

Bayraktar H.H., Morgan E.F., Niebur G.L., Morris G.E., Wong E.K., Keaveny T.M., 2004. Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue. *J. Biomech* 37(2004) 27-35

Bilezikian J.P., Raisz L.G., Martin T.J., 2008. *Principles of Bone Biology*, Third Edition

Bonfield, W., Li, C.H., 1968. The temperature dependence of the deformation of bone. *J Biomech.* 1, 323-329.

Bonfield, W., Tully, A.E., 1982. Ultrasonic analysis of the Young's modulus of cortical bone. *J Biomed Eng.* 4, 23-27.

Cammertoni G., 2011. Misura in vitro delle sollecitazioni in femori intatti e in condizioni di carico fisiologiche. Tesi di laurea in ingegneria biomedica

Cowin, S., 2001. *Bone Mechanics Handbook*. Second edition, CRC Press, Boca Raton, USA.

Cristofolini L., "Stress shielding Testing Protocol MPP/4/Rev.2", 1995

Cristofolini L., 2013. Tessuti connettivi calcificati o tessuti ossei. Dispense di meccanica dei tessuti biologici. <http://campus.unibo.it/50787/>

Cristofolini L., Juszczak M., Taddei F., Viceconti M., 2008. Strain distribution in the proximal human femoral metaphysis. *Journal of engineering in medicine* Vol. 223 Part. H
Cristofolini L., Pallini F., Schileo E., Juszczak M., Varini E., Martelli, S., Taddei F., 2006. Biomechanical Testing of the Proximal Femoral Epiphysis: Intact and Implanted Condition. *ASME Conference Proceedings* 2006, 431-440.

Crocker S.L., Clement J.C., Donlon D., 2009. A comparison of cortical bone thickness in the femoral midshaft of humans and two non-human mammals. *Journal of Comparative Human Biology* 60 (2009) 551–565

Currey J.D., 1990. "Physical characteristics affecting the tensile failure properties of cortical bone", *J. Biomech.* 8: 837-844, 1990

Fung, Y.C., 1993. *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues.*

Fyhrie D.P., Vashishth D., 2000. Bone stiffness predicts strength similarly for human vertebral cancellous bone in compression and for cortical bone in tension. *Bone* vol. 26 no. 2. February 200: 169-173.

Goh, J.C., Ang, E.J., Bose, K., 1989, Effect of preservation medium on the mechanical properties of cat bones. *Acta Orthop Scand.* 60, 465-467

GOM (2008). "Aramis. User information - Hardware."

GOM (2009). "Aramis. User manual - Software."

Hamer, A.J., Strachan, J.R., Black, M.M., Ibbotson, C.J., Stockley, I., Elson, R.A., 1996. Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone. *J Bone Joint Surg Br.* 78, 363-368.

Kammers A.D., Daly S., 2011. Small-scale patterning methods for digital image correlation under scanning electron microscopy. *Measurement Science and Technology* 22 (2011) 125501

Kaneko T.S., Pejčić M.R., Tehranzadeh J., Keyak J.H., 2002. Relationships between material properties and CT scan data of cortical bone with and without metastatic lesions. *Medical Engineering & Physics* 25(2003) 445-454

Koester K.J., Ager III J.W., Ritchie R.O., 2008. The true toughness of human cortical bone measured with realistically short cracks. *Nature materials* vol.7 (2008)

Koester K.J., Barth H.D., Ritchie R.O., 2010. Effect of aging on the transverse toughness of human cortical bone: Evaluation by R-curves. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 4 (2011) 1504-1513

Lee T.C., Staines A., Taylor D., 2012. Bone adaptation to load: microdamage as a stimulus for bone remodelling. *J. Anat.* 2012 December 201(6) 437-446

Leng H., Rejes M.J., Dong N.X., Wang X., 2012. Effect of age on mechanical properties of the collagen phase in different orientations of human cortical bone. *Bone* 55 (2013) 288-291

Li S., Demirci E., Silberschmidt V.V., 2013a. Variability and anisotropy of mechanical behavior of cortical bone in tension and compression. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 21 (2013) 109-120

Li S., Abdel-Wahab A., Silberschmidt V.V., 2013b. Analysis of fracture processes in cortical bone tissue. *Engineering fracture mechanics*

Linde, F., Sorensen, H.C., 1993, The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech.* 26, 1249-1252.

Lionello et al. Applicazione del pattern su provini da sottoporre a Digital Image Correlation (DIC). *MPP* 33, 2011.

Lionello G., 2012. Messa a punto del metodo di correlazione digitale di immagine per applicazioni biomediche. Tesi magistrale in ingegneria meccanica

Malluche, H.H., Faugere, M.C., 1986. Atlas of mineralized bone histology. Karger AG, Basel, Switzerland.

McElhaney, J., 1966. Dynamic response of bone and muscle tissue. *Journal of Applied Physiology* 21 (1966) 1231-1236

Morgan E.F., Keaveny T.M., 2001. Dependence of yield strain of human trabecular bone on anatomic site. *Journal of Biomechanics* 34(2001) 569-577

Nalla R.K., Kruzic J.J., Kinney J.H., Balooch M., Ager III J.W., Ritchie R.O., 2005. Role of microstructure in the aging-related deterioration of the toughness of human cortical bone. *Materials Science and Engineering C* 26 (2006) 1251-1260

Nalla R.K., Kruzic J.J., Kinney J.H., Ritchie R.O., 2005. Mechanistic aspects of fracture and R-curve behavior in human cortical bone. *Biomaterials* 26 (2005) 217-231

Ohman C., Baleani M., Pani C., Taddei F., Alberghi M., Viceconti M., Manfrini M., 2011. Compressive behaviour of child and adult cortical bone. *Bone* 49 (2011) 769-776

Reilly D.T., Burstein A.H.. 1974. The mechanical properties of cortical bone. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, Volume 56, Issue 5

Reilly D.T., Burstein A.H.. 1975. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *Journal of biomechanics* 8 (1975) 393-396

Robert L., Nazaret F., Cutard T., Orteu J.J., 2007. Use of 3-D Digital Image Correlation to characterize the mechanical behaviour of a Fiber Reinforced Refractory Castable. *Experimental Mechanics* 47 (2007) 761-773

Ruff C. B., Hayes W.C., "Cross-sectional geometry of Pecos Pueblo femora and tibiae - A biomechanical investigation: I. Method and general patterns of variation", *American Journal of Physical Anthropology* 60: 359-381, 1983.

Schreier H.W., Braasch J.R., Sutton M.A., 2000. Systematic errors in digital image correlation caused by intensity interpolation. *Opt. Eng.* 39(11) 2915-2921

Sears W.G., Winwood R.S., 1975. *Anatomy and physiology for nurses and students of human biology*. Published by Edward Arnold Ltd., London

Sedlin, E.D., Hirsch, C., 1966, Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. *Acta Orthop Scand.* 37, 29-48.

Szabò M.E., Thurner P.J., 2012. Anisotropy of bovine cortical bone tissue damage properties. *Journal of biomechanics* 46(2013) 2-6

Sutton, M.A. & Orteu, J.J. & Schreier H.W. 2009. *Image Correlation for Shape, Motion and Deformation Measuring*. Springer Science, Business Media LLC

Treece G.M., Gee A.H., Mayhew P.M., Poole K.E.S., 2010. High resolution cortical bone thickness measurement from clinical CT data. *Med Image Anal.* 2010 June; 14(3): 276–290.

Unger S., Blauth M., Schmoelz W., 2010. Effects of three different preservation methods on the mechanical properties of human and bovine cortical bone. *Bone* 47(2010) 1048-1053

Weaver, J.K., 1966, The microscopic hardness of bone. *J Bone Joint Surg Am.* 48, 273-288.

Williams P.L., 1995. *Gray's anatomy*. 38th edition, Churchill Livingstone, London, UK

Weiss, L., 1990. *Cell and tissue biology, A Textbook of Histology*. Urban & Schwarzenberg, Baltimore.

Williams, P.L., 1995. *Gray's anatomy*. 38th edition, Churchill Livingstone, London, UK.

Yamada S., Tadano S., Fujisaki K., Kodaki Y., 2012. Influence of osteon area fraction and degree of orientation of HAp crystals on mechanical properties in bovine femur. *Journal of biomechanics* 46(2013) 31-35

Yeni Y.N., Brown C.U., Wang Z., Norman T.L., 1997. The Influence of Bone Morphology on Fracture Toughness of the Human Femur and Tibia. *Bone* 21(1997) 453-459

Zhang J., Jin G.C., Meng L.B., Jian L.H., Wang A.Y., Lu S.B., 2005. Strain and mechanical behaviour measurements of soft tissues with digital speckle method. *Journal of Biomedical Optics* 10(3), 034021

Zioupos P., Currey J.D., 1998. Changes in the Stiffness, Strength, and Toughness of Human Cortical Bone With Age. *Bone* 22 (1998) 57-66

Zioupos P., 2000. Accumulation of in-vivo fatigue microdamage and its relation to biomechanical properties in ageing human cortical bone. *Journal of microscopy* 201 Pt.2 (2001) 270-278

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio innanzitutto l'Istituto Ortopedico Rizzoli per avermi dato la possibilità di sviluppare questa tesi.

Ringrazio il mio relatore, il Prof. Luca Cristofolini, il quale mi ha introdotto alla meccanica dei tessuti biologici e mi ha dato l'opportunità di sviluppare questo argomento per la preparazione della tesi.

Ringrazio tutti i componenti del Laboratorio di Tecnologia Medica in particolare l'Ing. Massimiliano Baleani che mi ha permesso di sviluppare questo progetto di ricerca e mi ha accompagnato dall'inizio alla fine. Grazie infinite Max anche per la fiducia che hai sempre avuto in me e per come hai saputo sostenermi e farmi sorridere anche nei momenti più duri. Sono orgoglioso di averti conosciuto e di aver avuto la possibilità di affiancarti durante tutto il tempo necessario alla realizzazione della tesi.

Ringrazio Paolo per la disponibilità con cui ha pazientemente risposto alle mie infinite domande fornendomi ogni volta un consiglio utile. Ringrazio Giacomo per l'aiuto con il DIC e per avermi consigliato la geniale idea degli estensometri attaccati: senza di te forse starei ancora provando a montare gli elastici con l'uncinetto sul primo provino. Ringrazio Luigi per la disponibilità con cui mi ha sempre aiutato sin da quando si doveva ancora laureare e lo affiancavo nelle sue prove. Ringrazio Lorenzo per avermi insegnato ad usare la fresa CNC e per avermi aiutato nella realizzazione delle attrezzature. Ringrazio Roberta per come ha saputo aiutarmi facendomi sembrare banali passaggi per me difficili. Ringrazio Chiara per la pazienza con cui ha scansionato ed elaborato i miei inaspettati provini. Ringrazio inoltre tutti coloro che anche solo con un caffè in compagnia hanno contribuito a rendere piacevole ogni giornata di tirocinio.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia per avermi dato la possibilità di raggiungere questo traguardo senza farmi mai mancare nulla.

Ringrazio gli amici dell'università in particolare Matteo, Gabriele e Davide per tutti i momenti insieme tra chiacchiere e progetti.

Ringrazio di cuore gli amici di sempre Gode, Ferro, Melo e Tondo per tutti i momenti insieme a ridere davanti a una birretta.

Ci tengo a ringraziare anche tutti gli amici del pala che tra partite e fantacalcio mi hanno fatto passare un'infinità di momenti divertenti.

Infine un ringraziamento speciale va a Sara: mi sei stata a fianco per gran parte del percorso universitario e con ogni minimo gesto hai contribuito a farmi vivere momenti felici senza i quali sarebbe stato tutto più complicato. Hai avuto l'arduo compito di sopportarmi perciò gran parte del merito è anche tuo se sono arrivato fino qui.